

**DIE BEDEUTUNG DER BAKTERIEN DES
SOGENANTEN ROTEN KOMPLEXES NACH
SOCRANSKY IN DER ÄTIOLOGIE
DER PARODONTITIS**

-

EINE AKTUELLE LITERATURÜBERSICHT

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor medicinae dentariae“ (Dr. med. dent.)
vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Schiller- Universität Jena**

von Maja Anna-Böttcher M.Sc.

geboren am 15. 08.1972 in Greifswald

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena**
- 2. Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Jena**
- 3. PD Dr. Siegrun Eick, Bern/Schweiz**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6.09.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	6
2.1 Parodontale Erkrankungen	6
2.2 Bakterielle Komplexe nach Socransky	8
2.3 Immuno-mikrobielle Pathogenese, Dysbiose und Wirtsreaktivität.....	11
3 Aufgabenstellung	13
4 Material und Methode.....	14
5 Ergebnisse und Diskussion	17
5.1 Bakterielle Virulenzfaktoren	17
5.2 Porphyromonas gingivalis.....	17
5.2.1 Klassifikation und Charakteristika	17
5.2.2 Virulenzfaktoren von Porphyromonas gingivalis	20
5.3 Tannerella forsythia.....	34
5.3.1 Klassifikation und Charakteristika	34
5.3.2 Virulenzfaktoren von Tannerella forsythia	35
5.4 Treponema denticola	42
5.4.1 Klassifikation und Charakteristika	42
5.4.2 Virulenzfaktoren	43
5.5 Polymikrobielle Synergie, Biofilmbildung und Therapieansätze	50
6 Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
clp	caseinolytisches System
ECV	extracelluläre Vesikel
Fim	Fimbrilin
ICAM-1	vascular cell adhesion molecular 1
INF γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
Kgp	Gingipain K
LLR	Leucin-rich repeat proteins
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MMP	Matrix- Metalloproteinase
OPF	open reacting frame
P.g.	Porphyromonas gingivalis
PGE2	Prostaglandinrezeptor E2
PGMA	Porphyromonas gingivalis outer membrane protein A gene
PPAD	Peptidylarginin-Deiminase
RANKL	rezeptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Rgp	Gingipain R
T.d.	Treponema denticola
T.f.	Tannerella forsythia
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TLR	Toll-like-receptors
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
VimA	virulence modulating

1 Zusammenfassung

Die chronische Parodontitis und ihre Folgeerscheinung, der Zahnverlust, stellen ein schwerwiegendes gesundheitliches, wirtschaftliches und soziales Problem dar. Eine Gruppe von Parodontopathogenen, welche als ‚Roter Komplex‘ bezeichnet wird (*Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythia* (T.f.) und *Treponema denticola* (T.d.)), ist in ihrem Auftreten mit der aggressiven und chronischen Verlaufsform der Parodontitis assoziiert. Ihre Vertreter haben jedoch nicht nur einen Einfluss auf die Entstehung der Parodontitis sondern werden auch bei anderen Erkrankungen nachgewiesen und sind möglicherweise in deren Ätiologie kausal impliziert (z.B. Arteriosklerose, rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Alzheimer's Erkrankung, Diabetes, ischaemische Herzerkrankungen und Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts). Die durch diese Mikroorganismen verursachte Problematik ist also sehr weitreichend und erfordert eine umfassende Aufklärung der zugrundeliegenden Pathogenitätsmechanismen.

Parodontale Gesundheit stellt einen Zustand dar, in dem sich antimikrobielle, pro-inflammatorische Aktivitäten (welche die Infektion kontrollieren) und anti-inflammatorische Regelkreise der Entzündungsresolution in einem dynamischen Gleichgewicht befinden. Diese homeostatische Balance kann einerseits durch Veränderungen des Habitats (z.B. immunologische, genetische oder von außen wirkende Umweltfaktoren) oder aber durch das Wirken von ‚Keystone-Pathogenen‘ gestört werden. Unter den Vertretern des ‚Roten Komplexes‘ nimmt P.g. die Rolle eines solchen Keystone-Pathogens ein. Trotz der symbiotischen Beziehung, die die Mikrobiota im gesunden Zustand mit dem Wirt führt, so besitzen ihre Vertreter dennoch Virulenzfaktoren, welche - wenn das Bakterium mengenmäßig stark anwächst - eine andere Relevanz erlangen können als während des symbiotischen Zustands. Diese Rolle der sog. ‚Pathobionten‘ kommt im ‚Roten Komplex‘ den Bakterien T.d. und T.f. zu, da sie auch in der gesunden Mikrobiota vorkommen, sich unter bestimmten Umständen jedoch unverhältnismäßig stark vermehren und in Folge die Pathogenese vorantreiben.

Porphyromonas gingivalis ist ein anaerober, asaccharolytischer und proteolytischer Organismus, dessen Überleben und Wachstum von Abbauprodukten, die bei der inflammatorischen Gewebszerstörung entstehen, abhängt. Während P.g. sich dem Angriff durch das Immunsystem geschickt zu entziehen vermag, fördert das Bakterium gleichzeitig das für das eigene Überleben so günstige inflammatorische Milieu. Die Vermutung, dass P.g. seine Stellung als ‚Keystone-Pathogen‘ durch Initiierung der Dysbiose (also der aus

Veränderung der mengenmäßigen Anteile verschiedener Spezies in der dentalen Plaque resultierenden Verwandlung einer harmlosen symbiotischen in eine krankheitsassoziierte Mikrobiota) erlangt, bestätigt sich auch im Tiermodell, wo P.g. die Zusammensetzung der Mikrobiota zu verändern vermag, was zu pathogenen Veränderungen wie Knochenabbau führt.

Obwohl der Hauptaspekt der pathogenen Aktivität von P.g. wohl in der Induktion der Dysbiose liegt, so verfügt es doch über eine Vielzahl gut charakterisierter Virulenzfaktoren. Es exprimiert z.B. drei Proteasen, Gingipaine genannt, die das umgebende Gewebe proteolytisch angreifen, spezifisch Komponenten des Komplementsystems inaktivieren, sowie bei der Zellinvasion und der Hämagglutination beteiligt sind. Stark virulent wirken ebenfalls die Fimbrien, bakterielle Zellfilamente, die für Auto- und Koaggregation, die Ausbildung von Biofilmen und die Zellinvasion wichtig sind. Die Kapselpolysaccharide vermitteln einen Schutz vor dem Angriff des Immunsystems während die Lipopolysaccharide, normalerweise stark immunogen wirkende Oberflächenbestandteile, nur eine außergewöhnlich schwache Reaktion des Immunsystems verursachen.

Auch bei *Tannerella forsythia*, einem ebenfalls anaerob lebenden, assaccharolytischen Bakterium, können einer Reihe von Proteinen putativ pathogene Funktionen zugeordnet werden. Beim Vergleich von *Tannerella forsythia* mit einer nicht-pathogenen Form von *Tannerella* (BU 063, oral taxon 286) zeigte sich, dass letztere für die Faktoren Karilysin, PrtH und BspA defizient ist, was deren Bedeutung als robuste Virulenzfaktoren untermauert. Das Oberflächenprotein BspA spielt eine maßgebliche Rolle bei der Adhäsion an und Invasion von Epithelzellen durch T.f., indem es spezifisch Aktin-Zytoskelett Rearrangements aktiviert. Es induziert außerdem über den Rezeptor TLR2 (‘toll-like receptor 2’) die Freisetzung von Chemokinen aus Epithelzellen und von pro-inflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen. Das Protein PrtH könnte durch seine proteolytische Wirkung die Ablösung des parodontalen Gewebeverbands vom Zahnsubstrat unterstützen, jedoch werden aus manchen Patienten auch Isolate ohne funktionelle PrtH isoliert, was die *in-vivo* Relevanz als Virulenzfaktor in Frage stellt. Die Metalloproteinase Karilysin kann Tumornekrosefaktor alpha (Tnf- α), das antibakterielle Peptid LL-37 sowie mehrere Komponenten des Komplementsystems inaktivieren und hat daher ein sehr starkes virulentes Potential. Interessant ist ebenfalls der charakteristische ‘S-Layer’, der die Autoaggregation beeinträchtigt und das Bakterium für das Immunsystem schlechter erkennbar macht. Faktoren des Komplementsystems können nicht binden, und der MAC (‘membrane attack complex’) kann nicht rekrutiert werden. Die mangelhafte Immunabwehr erlaubt es T.f., TLR2 vermittelt Th2-Antworten zu induzieren und dadurch zur Gewebe- und Knochenzerstörung beizutragen. Von T.f. exprimierte

Glycosidasen, Lipoproteine, Lipopolysaccharide und der Proteaseinhibitor Miropin sind weitere Kandidaten, die aufgrund ihrer Funktionen als Virulenzfaktoren eine Rolle spielen könnten.

Treponema denticola, ein Vertreter der oralen Spirochaeten, ist das einzige motile Bakterium im ‚Roten Komplex‘ und diese Eigenschaft ermöglicht es ihm, orale Epithelzellen zu besiedeln. Im Tiermodell kann T.d. Knochenabbau induzieren, was eine ursächliche Rolle der Virulenzfaktoren von T.d. bei der Gewebszerstörung im Rahmen der Parodontitis nahelegt. Das Protein Msp kann Poren in der Zellmembran bilden und interagiert mit zahlreichen Bindegewebsbestandteilen. Es kann wie BspA von T.f. in den Aktinmetabolismus eingreifen und ist dadurch wahrscheinlich am Invasionspotential von T.d. beteiligt. Außerdem kann es TLR2-vermittelt Makrophagen aktivieren und zur TNF- α Ausschüttung anregen. TDE0471, ebenfalls ein Oberflächenantigen, verhindert die Bindung des MAC an das Bakterium und schwächt daher die Immunantwort gegen das Bakterium. TDE0214, ein c-di-GMP bindendes Protein, ist wichtig für Motilität, die Ausbildung von Biofilmen und die Invasivität und wirkt außerdem immunstimulierend. Unter den verschiedenen als Virulenzfaktoren von T.d. postulierten Lipoproteinen ist Dentilisin das am besten untersuchte. Es beeinflusst interzelluläre Signalwege durch Abbau von Signalmolekülen (IL-1b, IL-6, TNF- α und Msp1) und moduliert dadurch Immunantworten. Es greift die interzelluläre Matrix proteolytisch an und unterstützt dadurch die Penetration von Epithelzellen. Außerdem bindet Dentilisin wie der RgpA-Kgp Komplex von P.g. an Fibrinogen und bewirkt dessen Abbau, was Blutungsereignisse unterstützt. Dentilisin ist außerdem an der Ko-aggregation von T.d. beteiligt. Ein wichtiger Aspekt der Virulenz ist dabei auch, dass Dentilisin Komplementkomponenten, die zuvor durch das ebenfalls von T.d. exprimierte FhbB gebunden wurden, spaltet und inaktiviert. Das T.d. Enzym Cystalisin ist an einem Stoffwechselweg beteiligt, der in der Produktion von H₂S resultiert und beteiligt sich an der Pathogenese wohl durch Gewebeschädigung und Deregulation der Wirtsantwort. Mit Hilfe von Oberflächen-Vesikeln können Virulenzfaktoren in tiefere Gewebeschichten transportiert und dabei vor Abbau geschützt werden.

Wie oben dargelegt können einer großen Anzahl von Proteinen, die von Vertretern des ‚Roten Komplexes‘ exprimiert werden, putativ pathogene Funktionen zugeordnet werden. Jedoch sollte man beachten, dass unterschiedliche experimentelle Ansätze zur Untersuchung gewählt wurden und es nicht immer möglich ist, die tatsächliche Bedeutung der jeweils in vitro beobachteten Effekte für den Pathogeneseverlauf abzuschätzen.

Trotz der Vielzahl an Virulenzfaktoren und ihren strukturellen Unterschieden gibt es doch augenscheinliche Gemeinsamkeiten betreffs der Angriffspunkte: Verschiedene Faktoren

sind z.B. an der Adhäsion und Invasion von Epithelzellen beteiligt, ein Charakteristikum, das es den Bakterien erlaubt, in einem Reservoir zu ruhen, ohne vom Immunsystem angegriffen zu werden. (Gingipaine und Fimbrien von P.g., S-layer und BspA von T.f. und Msp, Dentilisin, LRR Proteine und TDE0214 von T.d.). Die meisten der gebildeten Proteasen besitzen das Potential, umliegendes Gewebe proteolytisch anzugreifen, manchmal auch die Blutungsneigung zu erhöhen. Andere Proteine wiederum haben Mechanismen entwickelt, Komponenten des Komplementsystems unschädlich zu machen (die Gingipaine von P.g., das Karilysin von T.f. und TDE0471 und FhbB von T.d.). Außerdem induzieren zahlreiche Faktoren die Zytokinexpression in Epithelzellen oder Zellen des Immunsystems (GroEL und Fimbrien von P.g., BspA, PrtH, Karilysin, LPS und Lipoproteine von T.f. und Msp, OppA und Dentilisin von T.d.), oft über den TLR2 (z.B. LPS von P.g.). Die immunologische Wirtsantwort auf Parodontopathogene - vor allem auf ihre Oberflächenstrukturen, mit denen sie mit ihrer Umwelt in Kontakt treten, und auf ihre metabolischen Produkte – ist eine kritische Determinante im Fortschreiten der Parodontitis.

Neben diesen Gemeinsamkeiten sind auch mehrere Genprodukte der Vertreter des ‚Roten Komplexes‘ an der Ko-Aggregation untereinander und damit an der Entstehung des Biofilms und der polymikrobiellen Synergie beteiligt (Fimbrien von P.g., LrrA und Dentilisin von T.d.) Das Virulenzpotential der drei Mikroorganismen ist eng an ihre Lebensart im oralen Biofilm gekoppelt. Kenntnisse darüber, welche Prozesse die Bildung von Biofilmen unterstützen oder unterbrechen könnten hilfreich für den Eingriff in orale Pathogeneseabläufe sein.

Das Modell des ‚roten Komplexes‘, in dem dessen drei Vertreter als Hauptverursacher der Parodontitis dargestellt werden, erwuchs aus der Tatsache, dass ihre Bedeutung aufgrund ihres besseren Wachstums in der Zellkultur überschätzt wurde. Heute nutzt man metagenomische Ansätze um die Beteiligung verschiedener Spezies am Plaque genauer zu definieren, mit dem Ergebnis, dass Hajishengallis 2012 das allgemeiner formulierte Modell der polymikrobiellen Synergie und Dysbiose aufstellte. Die Entwicklung problematischer Verlaufsformen der Parodontitis resultiert demgemäß aus der Dysbiose der parodontalen Mikrobiota infolge der Zerstörung der Wirt-Mikroben Homöostase.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen der verschiedenen Virulenzfaktoren von P.g., T.f. und T.d. anhand aktueller Forschungsergebnisse erläutert und ihre mögliche Bedeutung für die Pathogenese der Parodontitis in vivo abgeschätzt. Der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien liegen genaue Kenntnisse der Charakteristika und Virulenzmechanismen der verursachenden Organismen zugrunde, und diese Arbeit soll hierfür eine Grundlage bieten.

2 Einleitung

2.1 Parodontale Erkrankungen

In der Mundhöhle finden sich hunderte verschiedener Mikroorganismen, die mit dem Wirtsorganismus im nicht krankmachenden ökologischen Gleichgewicht stehen. Etwa die Hälfte hiervon ist bisher kultivierbar und folglich näher charakterisiert (Socransky et al., 1994; Paster et al., 2001). Sie können nützlich, unbedeutsam (auch Kommensale oder Residente genannt) oder schädlich sein (Wolf und Rateitschak, 2012). Opportunistische Keime, also fakultativ pathogene Erreger, die nur im abwehrgeschwächten Wirt pathogen sind, finden sich oft in der kommensalen Flora der Mundhöhle. Normalerweise schädigen sie den Wirt nicht. Bei bestimmten Dispositionen wie z.B. Resistenzverminderung, Existenz von Risikofaktoren oder Immunsuppression kann es jedoch zu einer selektiven Vermehrung von Bakterien mit Virulenzfaktoren, und so zu einer opportunistischen Infektion wie der Parodontitis kommen.

Die Gingivitis, welche sich auf das marginale suprakrestale Weichgewebe beschränkt, manifestiert sich klinisch durch Blutung bei Sondierung des gingivalen Sulkus, in schweren Fällen durch Rötung und Schwellung besonders im Bereich der Papillen (Wolf & Rateitschak 2012). Durch Veränderungen des oralen Mikrobioms, dem Überhandnehmen parodontopathogener Bakterien in Zusammenhang mit einem veränderten, reduzierten Immunstatus sowie der Präsenz von Risikofaktoren kann sich aus der Gingivitis eine Parodontitis entwickeln: Die Entzündung der Gingiva greift dann auf die tieferen Strukturen des Zahnhalteapparates über. Es kommt zur Desintegration des Kollagens und zum Knochenabbau (Attachmentverlust). Das Saumepithel wandelt sich in ein Reservoir für opportunistische pathogene Bakterien, welche ein Fortschreiten der Parodontitis fördern können. Aufgrund der physiologischen Zusammenhänge können die Gingivitis und die Parodontitis ineinander übergehen.

Die Parodontitis als bakteriell verursachte entzündliche Erkrankung aller Anteile des marginalen Parodontiums (d.h. der Gingiva, des Desmodontiums, der Wurzelzementes und des Alveolarknochens) zeigt sich klinisch in der Bildung von Zahnfleischtaschen und dem Auftreten von Attachmentverlust sowie von Knochenresorption. Durch fortschreitenden Abbau des Stützgewebes kann dies bis zum Zahnverlust führen (Haunfelder et al. 1990). Die Parodontitis verläuft in vier klinisch voneinander abgrenzbaren Phasen (Gaengler et al. 2005, Wolf und Rateitschak 2012):

Das erste Stadium beschreibt die „Erste Reaktion des gesunden Parodonts auf die Plaque“. Plaquebakterien des marginalen Parodonts produzieren in ihrem Stoffwechsel Metaboliten,

die das Saumepithel veranlassen, Entzündungsmediatoren zu sezernieren. Freie Nervenendigungen, die nicht unmittelbar von Blutgefäßen durchzogenen Gewebestrukturen wie dem Saumepithel oder der freien und der anhaftenden Gingiva, produzieren in Folge Neuropeptide und Histamin, die die lokale Gefäßreaktion hochregulieren. Auch perivaskuläre Mastzellen setzen Histamin frei, welches das Endothel veranlasst, den Entzündungsmediator Interleukin-8 (IL-8) in das Gefäß auszuschütten.

Das zweite Stadium beschreibt die „Aktivierung von Makrophagen und des Serumproteinsystems“. Die in Stadium I beschriebene vaskuläre Reaktion bewirkt, dass Serumproteine, z.B. Komplement, aus den postkapillären Venolen ins Bindegewebe übertreten und eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen. Aktivierte Makrophagen produzieren in der Folge Entzündungsmediatoren.

Das dritte Stadium der Pathogenese der Parodontitis umfasst das „Hochregulieren der Aktivität der Entzündungszellen, das Ablösen des Saumepithels und die Bildung einer gingivalen Tasche“. Das bindegewebige entzündliche Infiltrat wird jetzt von Lymphozyten dominiert. Aktivierte T-Zellen koordinieren die Immunantwort auf die Plaque mittels Zytokinen (IL-2 bis -6, IL-10 und -13, Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interferon gamma (INF γ)). Um die Erreger abzuwehren produzieren Plasmazellen Immunglobuline und Zytokine. Aktivierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten sezernieren diverse Zytokine, Leukotriene (LTB $_4$: Chemotaxis) und Matrix-Metallproteinasen (MMP), welche bei der Destruktion des Bindegewebes und des Knochens eine zentrale Rolle einnehmen. Aktivierte Fibroblasten produzieren statt Kollagen Matrix-Metallproteinasen und deren Gegenspieler TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase). Die Infiltratmenge wird größer.

Das vierte Stadium bildet den „Ersten Attachmentverlust des parodontalen Gewebes“. Im infiltrierten Bindegewebe findet sich nun eine erhöhte Aktivität der Makrophagen sowie an Mediatoren entzündlicher Prozesse. Immuninkompetente Zellen wie Fibroblasten produzieren zahlreiche Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) sowie Prostaglandinrezeptor E2 (PGE $_2$), MMP und TIMP. Plasmazellen dominieren das Infiltrat, was ein Kennzeichen für eine fortgeschrittene parodontale Läsion ist (Thorbert-Mros et al. 2014). Die gestörte Hämostase führt zum Abbau von Kollagen, Matrix und Knochen.

Epidemiologische Daten der deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV (2007)) ergaben, dass bei ca. 37 Mio. Erwachsenen eine moderate bis schwere Parodontitis nachgewiesen werden kann, wobei zwischen 1997 und 2005 ein deutlicher Anstieg (bei 35- bis 44-jährigen: 32.2% auf 52.7% bei mittelschweren und 14.1% auf 20.5% bei schweren Parodontitiden) zu verzeichnen war. Unverändert waren Zahnkaries (29,7 %) und Parodontitis (28,5 %) die beiden Hauptursachen, die letztlich eine Zahnentfernung erforderlich machten; ab dem 40.

Lebensjahr dominierte die Parodontitis als zahlenmäßiger Hauptgrund einer Zahnextraktion (Glockmann et al 2007). Aktuelle Ergebnisse der V. Mundgesundheitsstudie werden laut Institut der Deutschen Zahnärzte im Frühjahr 2016 erwartet.

2.2 Bakterielle Komplexe nach Socransky

Die Ende des 19. Jhs. beginnende Suche nach dem ätiologischen Agens, einem einzelnen pathogenen Organismus, der gemäß der Koch'schen Postulate für die Entwicklung der Parodontitis verantwortlich gemacht werden konnte, endete erfolglos. Auch die ‚Unspezifische Plaque Hypothese‘, nach der die Menge aller Bakterien in der dentalen Plaque die Krankheit verursacht, erwies sich als nicht zufriedenstellend. Auf der Basis der spezifischen Plaquehypothese von Loesche (Loesche et al. 1972), nach der die Qualität der Mikroorganismen der Mundflora für die Parodontitis verantwortlich ist, entwickelte Dr. Sigmund Socransky schließlich aufgrund seiner Forschungsergebnisse 1998 (Socransky et al. 1998) ein Modell, wonach verschiedenen Stadien der entzündlichen Veränderungen am Parodontium das Vorkommen verschiedener Bakteriengruppen (sogenannter ‚Komplexe‘) zugeordnet werden kann. Es konnte im Fortschreiten des pathogenen Prozesses also eine gewisse Besiedlungsabfolge mit unterschiedlichen und für die jeweilige Phase charakteristischen Clustern von Pathogenen von gram-positiven hin zu gram-negativen Organismen festgestellt werden (microbial shift disease). Die Beobachtung, dass die entsprechenden Bakterien tatsächlich meist nicht alleine, sondern eben in diesen charakteristischen Kombinationen an Entzündungsherden gefunden werden, unterstützt die Hypothese, dass die Organismen der jeweiligen Komplexe während des pathogenen Prozesses bei der Zerstörung parodontalen Gewebes miteinander kooperieren (Darveau et al. 1997).

Die Gruppe um Socransky unterteilte parodontalpathogene Organismen in sechs unterschiedliche mikrobiologische Komplexe (Socransky et al. 1998, 2002). Die genannten Komplexe spiegeln bevorzugte Gemeinschaften von Mikroorganismen des subgingivalen Biofilms bei parodontal Erkrankten wieder. Die Unterteilung der einzelnen Komplexe weist auf eine engere Verwandtschaft der Organismen hin.

Die in der normalen Mundflora etablierten, grampositiven Keime wie Streptokokken und Actinomyces stellen den gelben Komplex der parodontalpathogenen Organismen dar. Sie werden von den sich im sauerstoffarmen Milieu des sich vertiefenden Sulkus von den

gramnegativen Anaerobiern verdrängt. Hierbei treten die Keime des grünen Komplexes (drei *Capnocytophaga*-Spezies), *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* und vormals *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotyp B, neu: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) auf. Letzterer wird in der Literatur aufgrund seiner hohen Pathogenität als Leitkeim für die aggressive Parodontitis gehandelt (Fives-Taylor et al. 1999, Fine et al. 2007, Amano 2010). Der violette Komplex der Actinomyceten reduziert sich zu Gunsten des großen orangenen und des roten Komplexes. Dies gilt nicht nur für die Relationen zueinander, sondern auch für die absoluten Zahlen (Socransky et al. 2002). Der orangene Komplex enthält hauptsächlich potenziell pathogene Keime, die in geringer Anzahl in jeder Mundhöhle zu finden sind und sich aufgrund der veränderten Pathologie stark vermehren. Die höchste Pathogenität der hier eingeteilten parodontalpathogenen Erreger weist der rote Komplex (*Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythia* (T.f.) und *Treponema denticola* (T.d.)) auf. So ist bei parodontal Erkrankten die Anwesenheit der Mikroorganismen dieses Komplexes bei der klinischen Messung auffällig mit Bluten auf Sondieren und Erhöhung der Sondierungstiefe verbunden (Haffajee et al. 1998, Holt et al., 2000). Parameter sind Rötung der Gingiva, Blutung auf Sondierung, Suppuration und Zusammensetzung der subgingivalen Besiedelung, welche eng mit der Sondierungstiefe korreliert. Damit einhergehend sind das vermehrte Auftreten respektive die größere Anzahl der Spezies des roten Komplexes wie auch des orangenen Komplexes (Haffajee et al. 2004). Spezies des roten Komplexes finden sich bei parodontal Erkrankten nicht nur an mehr Messstellen, sondern auch in erheblich größerer Konzentration (Socransky et al. 1998). Veränderungen der lokalen Gegebenheiten wie beispielsweise der Vertiefung von parodontalen Taschen, führen zu einem sprunghaften Anstieg der Konzentration der Spezies des orangenen und roten Komplexes, wohingegen *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 von solchen Veränderung der Bedingungen unbeeindruckt bleiben (Socransky et al. 1999).

Der Hauptunterschied zwischen supra- und subgingivaler Plaque von parodontal Erkrankten und Gesunden spiegelt sich ebenfalls in den Verhältnissen und außerordentlich hohen Spiegeln an Spezies des orangenen und roten Komplexes in der subgingivalen Plaque wider (Ximenez-Fyvie et al. 2000).

Unter diesen verschiedenen von Socransky definierten Komplexen ist der ‚rote Komplex‘ ein Kollektiv aus *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*, ein ‚später Besiedler‘, der erst dann auftritt, wenn vorher durch die Besiedlung mit anderen Mikroorganismen das entsprechende Umfeld geschaffen wurde (Bereitstellung von Nährstoffen, anaerobes Milieu etc.). Er besteht aus Formen, die für parodontale Pathogene

gehalten werden, da ihr Vorhandensein mit aggressiven Infektionsverläufen assoziiert ist (Socransky 1998). Untersucht wurden lange Zeit jedoch nur kultivierbare Spezies, und man weiß, dass weitere Bakterien in die Gruppe der späten Besiedler fallen, die jedoch aufgrund ihrer mangelnden Kultivierbarkeit noch nicht in dem Umfang untersucht und charakterisiert werden konnten, wie es für die Vertreter des ‚Roten Komplex‘ der Fall ist. Die Annahme, dass die drei Pathogene des ‚Roten Komplex‘ jedoch eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung der Parodontitis spielen, wird unterstützt durch Beobachtungen aus dem Rattenmodell, wo Knochenabbau durch Ko-Infektion mit diesen Bakterien hervorgerufen werden konnte, und darüber hinaus eine synergetische Wirkung der Parallelinfektion im Vergleich mit Infektion mit den einzelnen Bakterien gezeigt wurde (Kesavalu et al. 2007). Die Bakterien verfügen über zahlreiche Mechanismen, die Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen, und die als Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Die Parodontitis ist in ihrer Entstehung und Progression multifaktoriell bedingt, und während nur wenige Virulenzfaktoren unmittelbar an der Zerstörung des Parodonts beteiligt sind, beeinflussen viele die Wechselwirkung zwischen bakteriellern Stoffwechsel und immunologischer Reaktion des Wirts. Diese indirekten Pathogenesefaktoren, die in das immunologische Gleichgewicht eingreifen, sind wesentlich an der Entstehung der chronischen Parodontitis beteiligt. Die Erkenntnis, dass letztendlich die multifaktoriell beeinflusste Immunantwort des Wirts die Pathogenese der Parodontitis vorantreibt (Golub et al. 2006, Takashiba et al. 2006) führte dazu, dass sie 2008 als entzündliche und nicht länger als infektiöse Krankheit klassifiziert wurde (Konsensuskonferenz der American Academy of Periodontology, AAP)

2.3 Immuno-mikrobielle Pathogenese, Dysbiose und Wirtsreaktivität

Die Mundhöhle ist einer der ökologisch komplexesten Bereiche des menschlichen Körpers und ständig von einer heterogenen Mischung an Mikroorganismen besiedelt, die Lebensgemeinschaften wie Biofilme ausbilden. Das Immunsystem des Mundraumes ist dem Kontakt mit Pathogenen und fremdartigen Substanzen angepasst und wird durch viele komplexe immunologische Regelkreise kontrolliert. Bakterien bzw. bakterielle Faktoren wie z.B. Lipopolysaccharide können in Epithelzellen die Ausschüttung von Zytokinen auslösen. Es kommt in Folge zu einer Signalkaskade, die verschiedene Immunzellen und Signalmoleküle umfasst (Takashiba et al. 2003). Dies führt zur lokalen Aktivierung des Gefäßendothels, zur Infiltration weiterer Immunzellen und zur Progression der Entzündung (Page 1991). Diesem Prozess entgegen wirken anti-entzündliche Zytokine, die die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine hemmen und außerdem den Gewebeabbau bremsen (Seymour et al. 2001, Silva et al. 2015).

In gesundem Gewebe herrscht eine Balance zwischen pro- bzw. antientzündlichen Zytokinen und dem Entstehen einer Entzündungsantwort. Der durch mikrobielle Antigene verursachte Reiz beruht also letztendlich auf einer Störung dieser Balance. Menge und Aktivität der jeweiligen Zytokine sind jedoch direkt abhängig von individuellen Varianzen in der immunologischen Kompetenz, die u.a. durch genetische Faktoren, z.B. Genpolymorphismen an Interleukin-Loci, entstehen. Untersuchungen an Patienten mit der aggressiven Form der Parodontitis zeigten, dass zahlreiche Genloci (bzw. Mutationen in ihnen) an der Krankheitsentstehung beteiligt sein können und darüber hinaus wohl noch eine große Anzahl weiterer, bislang nicht identifizierter krankheitsrelevanter Risikoallele existiert (Vaithilingam et al. 2014). Auch andere endogene und exogene Faktoren wie Immundefekte, Blut- und Stoffwechselerkrankungen und andere systemische Erkrankungen (z.B. Diabetes), Mangelernährung, Stress oder Rauchen haben einen Einfluss auf die Suszeptibilität und den Krankheitsverlauf, und zwar sowohl auf die immunvermittelte Wirtsreaktivität als auch auf die pathogene Veränderung des dentalen Biofilms (Offenbacher et al. 2008, Fullmer et al. 2009, Pöllänen et al. 2013, Camelo-Castillo et al. 2015). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in der großen Mehrzahl der Fälle (> 85%) chronischer bzw. aggressiver Verlaufsformen der Parodontitis eine übersteigerte Reaktion des oralen Immunsystems auf die Pathogene zugrunde liegt (man spricht hier von ‚high responders‘). Interessanterweise konnte sogar dargestellt werden, dass sich unter anti-inflammatorischer Therapie ein Wandel von pathologischer zurück zu gesunder Mikrobiota

vollzieht (Barthold et al. 2013, Hajishengallis 2014). In anderen Fällen können jedoch auch Immundefekte für einen gewissen Prozentsatz an Parodontitisfällen verantwortlich gemacht werden (Amaya et al. 2013).

Entgegen früherer Meinungen ist die Rückkehr zum gesunden Gewebezustand nach einer Entzündung kein passiver sondern ein aktiver, stark regulierter Prozess, den man als Resolution bezeichnet. Chronische Entzündungen wie die Parodontitis sind möglicherweise generell durch ein Versagen der Entzündungsresolution und nicht durch die inflammatorische Stimulation an sich bedingt (Serhan et al. 2007, Serhan et al. 2008, Serhan 2008). Eine wichtige Stellung scheinen hier Makrophagen zu haben, indem sie bestimmen, ob der inflammatorische Prozess sich chronisch entwickelt oder es zu einer Entzündungsresolution kommt. (Zadeh et al. 1999, Hasturk 2012)

Scheitert die Resolution, so führt die Synthese weiterer Mediatoren zu Veränderungen des Bindegewebes und des Knochen-Metabolismus, zum Beispiel werden Osteoklasten aktiviert. Das den Zahn unterstützende Bindegewebe wird abgebaut, und es folgt die Ablösung der Gewebeverbände vom Zahn.

Zusammenfassend handelt sich also bei der Parodontitis also um eine bakteriell stimulierte destruktive Wirtsantwort, wobei der Entzündungsverlauf, die Entwicklung chronischer Formen und die Progression von Gingivitis zu Parodontitis sowohl vom (sich durch den mikrobiellen ‚shift‘ und mit Entstehen der Dysbiose sowie durch polymikrobielle synergetisch wirkende Virulenzfaktoren ändernden) mikrobiellen Reiz als auch von der ebenfalls multifaktoriell bedingten Wirtsreaktivität abhängen. Die Erkenntnis, dass ein Versagen im Prozess der Entzündungsresolution hier wohl eine wesentliche Rolle spielt, ist hinsichtlich der Entwicklung neuer Therapieansätze sehr interessant, da Faktoren der Resolution als neue Angriffspunkte genutzt werden können. Auch wenn weitere, bislang nicht identifizierte Mikroorganismen an der Pathogenese beteiligt sein mögen, so wird die relevante Implikation der drei Bakterien des ‚roten Komplexes‘ in der Entstehung der Parodontitis jedoch durch Experimente im Maus- und Rattenmodell deutlich dargestellt (Kesavalu et al. 2007).

3 Aufgabenstellung

Die Parodontitis stellt in steigendem Masse und weltweit eine Bedrohung für die Zahngesundheit dar. Die medizinischen, aber auch gesellschaftlichen und wirtschaftlich Folgen des Zahnverlusts sind immens, und stellen doch noch nicht den gesamten Umfang des Problems dar: Die Pathogene des roten Komplexes, die in die Pathogenese der Parodontitis impliziert sind, zeigen sich auch in erhöhtem Maße als mit anderen Erkrankungen beim Menschen assoziiert: Arteriosklerose, rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Alzheimer Erkrankung, Diabetes und ischaemische Herzerkrankungen und Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts sind einige Beispiele (Olsen 2015, Otomo-Corgel et al. 2102).

Zusammenhänge zwischen oraler und systemischer Gesundheit sind schon lange bekannt und von immer mehr Erkrankungen erkennt man, dass sie auf einer pathologischen Veränderung des Mikrobioms, der natürlichen mikrobiologischen Besiedlung verschiedener Organsysteme, beruhen. Dies macht die Parodontitis auch zu einem Modell der Pathogenese anderer Erkrankungen, über welche aus den Ergebnissen der Parodontitisforschung ebenfalls Rückschlüsse gezogen werden können (Khoct et al. 2014). Um erfolgreiche neue Therapieansätze entwickeln zu können muss zunächst möglichst umfassendes Wissen über die Pathogeneseabläufe, sowie die Virulenzfaktoren der in eine Krankheit implizierten Mikroorganismen gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher der derzeitige Kenntnisstand über Charakteristika und Virulenzfaktoren der Vertreter des roten Komplexes, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*, anhand aktueller Forschungsergebnisse zusammengefasst und diskutiert werden.

4 Material und Methode

Zur Beantwortung des Themas wurde eine systematische Literaturrecherche durchgeführt, mit dem Ziel, anhand der verfügbaren und identifizierten Literatur eine aktuelle Literaturübersicht zum gestellten Thema zu geben. Hierzu wurden die vorhandenen Quellen zum aktuellen Zeitpunkt sowohl deutschlandweit als auch aus dem internationalen Raum zusammengetragen.

Der Ablauf der systematischen Literaturrecherche gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

1. Bildung einer Suchstrategie einschließlich der Formulierung von differenzierten Unterfragestellungen und Festlegung von Keywords (Suchbegriffe, Schlüsselwörter).
2. Die eigentliche Literatursuche erfolgt dabei über zwei Zugänge:
 - a.) Systematische Recherche in ausgewählten Datenbanken;
 - b.) Zusatzrecherche per Hand über Durchsicht der Referenzlisten bereits gefundener Artikel nach neuen Literaturquellen („Reference Tracking“), sowie ergänzende Recherche in spezifischen, bei der systematischen Recherche nicht berücksichtigten Datenbanken.
3. Sichtung der Literatur und Auswahl der relevanten Literaturreferenzen mit Hilfe definierter Ein- und Ausschlusskriterien
4. Bewertung der Literatur nach Evidenz
5. Dokumentation der Ergebnisse

Grundlage für die systematische Literatursuche bildet eine auf das Thema zugeschnittene Suchstrategie. Zu dieser Suchfrage werden die jeweiligen Schlagworte (Keywords) für die Recherche in den Datenbanken festgelegt. Im folgenden Abschnitt wird die Suchfrage der entsprechenden Themas sowie die zugehörigen Keywords dargestellt.

Thema

Die Bedeutung der Bakterien des sogenannten roten Komplexes nach Socransky in der Ätiologie der Parodontitis- Eine aktuelle Literaturübersicht

Dem Thema entsprechend werden Keywords abgeleitet. Zudem wurden themenrelevante Artikel nach Schlagwörtern durchsucht und zur Vervollständigung in die Erarbeitung der Keywords einbezogen. Diese wurden in deutscher und englischer Sprache formuliert:

Socransky

Roter Komplex

Porphyromonas gingivalis

Treponema denticola

Tannerella forsythia

Parodontitis

Pathogenität

Virulenzfaktor

Die Suchabfrage erfolgte datenbankspezifisch: die einzelnen Datenbanken bieten neben „Limits“ (Einschränkungen) auch diverse Suchfilter an, mit deren Hilfe z.B. zeitliche und sprachliche Merkmale eingestellt werden müssen. Die Datenbanken wurden, abhängig von den Vorgaben und Möglichkeiten der jeweiligen Datenbank, wenn möglich nach Titel, Abstract und Keyword durchsucht. Durch die Bool'sche Mengenoperation konnten Schlagwörter miteinander verknüpft (AND) oder die Suchmenge mittels der Eingabe von OR erweitert werden.

Die Auswahl adäquater Datenbanken erfolgte nach eingangs definierter Kriterien. Für die vorliegende Studie waren ausschlaggebend das Fachgebiet, Evidenzgrad und Verfügbarkeit. Gemäß der Leitfrage, möglichst evidenzbasierte Kriterien zu identifizieren, erfolgte die Suche nach relevanten Studien zunächst in der Datenbank Cochrane Library, in der Studien mit dem höchsten Evidenzniveau erfasst sind.

Zudem wurde in der Meta-Datenbank PubMed recherchiert um andere Publikationen mit niedrigerem Evidenzniveau ebenfalls zu erfassen.

Generell wurde bei der Literatur teilweise eine zeitliche Einschränkung der letzten zehn Jahre vorgenommen.

Nachfolgend werden die beiden verwendeten Datenbanken beschrieben.

Cochrane Library

Diese ist eine Datenbank der Cochrane Collaboration, einem internationalen Netzwerk von Wissenschaftlern für Wissenschaftler und Ärzte, in der systematische Übersichtsarbeiten erstellt und für den Anwender zur Verfügung gestellt werden.

Es handelt sich um eine wissenschaftlich fundierte Informationsgrundlage, die es ermöglicht, den aktuellen Stand der klinischen Forschung in kurzer Zeit objektiv beurteilen zu können. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Cochrane Library hinsichtlich der Evidenzbasiertheit von Daten diejenigen Literaturreferenzen zusammenfasst, die das höchste Evidenzniveau aufweisen. Diese spiegeln sich beispielsweise in Meta-Analysen oder Reviews wider.

PubMed

Pubmed ist eine Meta-Datenbank und bibliographische Referenzdatenbank hauptsächlich im englischsprachigen Raum. Es werden internationale medizinische Fachartikel, insbesondere aus den vereinigten Staaten (National Library of Medicine, NLM) dokumentiert. Pubmed bietet einen kostenfreien Zugang zu den Datenbanken Medline, Oldmedline (vor 1966) sowie Pubmed Central.

Neben der systematischen Datenbankrecherche wurde zusätzlich eine Handrecherche vorgenommen. Hierfür wurde bei der Suche nach weiteren Referenzen systematisch in den Literaturlisten der bisher gefundenen Artikel recherchiert („Reference Tracking“).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Bakterielle Virulenzfaktoren

Unter Virulenzfaktoren versteht man diejenigen spezifischen Eigenschaften oder Bestandteile (struktureller oder metabolischer Natur) eines Pathogens, die zur Krankheitsentstehung und zum Krankheitsverlauf beitragen. Bei der Parodontitis tragen dabei einige dieser Virulenzfaktoren direkt zur Zerstörung von Parodont und Knochen bei. Wie bereits erwähnt kann die pathogene Wirkung jedoch auch indirekt, durch Aktivierung des Immunsystems, erfolgen. Viele der bakteriell exprimierten Faktoren, die zu einer Aktivierung des Immunsystems führen, werden in der Literatur als Virulenzfaktoren bezeichnet. Auch wenn prinzipiell die Parodontitis durch die Wirtsreaktivität vorangetrieben wird, so sollte man dennoch beachten, dass nicht jeder potentiell immunstimulierende Faktor unbedingt in die Krankheitsentstehung (und insbesondere in die chronische Verlaufsform) involviert sein muss. Außerdem ist auch jeder Schutzmechanismus, durch den sich das Bakterium dem Angriff durch das Wirtsimmunsystem widersetzt, ein potentieller Virulenzfaktor, da er dem Bakterium die Möglichkeit vermittelt, den Mundraum zu besiedeln und pathogene Veränderungen zu verursachen. In Folge werden also alle diejenigen Faktoren beschrieben, die ein Virulenzpotential besitzen. Ob und wie stark jenes jedoch ausgeprägt ist, ist oft noch Gegenstand andauernder Untersuchungen.

5.2 *Porphyromonas gingivalis*

5.2.1 Klassifikation und Charakteristika

Porphyromonas gingivalis (P.g.) ist ein gram-negativer, asaccharolytischer, obligat anaerober Mikroorganismus. Das stäbchenförmige Bakterium ist nicht-motil und bildet keine Sporen (Nakayama 2015). Es kann in vielen Bereichen des Mundraumes und auch in gesunden Probanden nachgewiesen werden. Es finden sich bei P.g. viele verschiedene Stämme und Genotypen und bei Patienten scheint jeweils ein Genotyp zu dominieren, ohne dass verschiedenen Genotypen eindeutig unterschiedliche Pathogenität zugeordnet werden kann. Bestimmte Kombinationen von Virulenzallelen sind jedoch mit Orten aktiver Parodontitis und andere eher mit gesundem Parodontium assoziiert (siehe auch unten) und in manchen Patienten werden auch besonders virulente Stämme gefunden (Yoshino et al. 2007). Durch horizontalen Gentransfer in dieser nicht-klonalen Population kommt es zu

neuen Allelkombinationen. Der hohe Grad an genetischer Diversifizierung bringt eine starke Flexibilität hinsichtlich unterschiedlicher Umwelteinflüsse mit sich: P.g. kann so schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren, wobei der bestangepasste Stamm klonal expandieren kann (Tribble et al. 2013).

Wie auch die anderen Mitglieder des ‚roten Komplexes‘ so kann auch P.g. erst ‚spät‘, d.h. dann, wenn dafür durch andere Mikroorganismen entsprechende Bedingungen geschaffen wurden, orale Habitate besiedeln: Gesichert sein müssen zunächst die Bereitstellung von notwendigen Nährstoffen durch metabolisch kompetente Arten, ein zunehmend anaerobes Milieu und durch die Anhaftung anderer Bakterien entstehende Bindungsstellen (Lamont et al. 1998).

Die Fähigkeit zur Auto- und Koaggregation stellt eine wichtige Voraussetzung für die Besiedlung neuer Habitate dar und P.g. kann an Oberflächen binden und so ein Bestandteil von Biofilmen werden. Die Adhärenz wird hierbei über Fimbrien (hitzebeständige Filamente, die für die Bindung an eine Vielzahl von Substraten nötig sind) und Proteine der Außenmembran vermittelt. Die Ausbildung einer Polysaccharidkapsel, wie sie einige Stämme bilden, vermindert hingegen die Adhärenz (Wang et al. 2014). Die Besiedlung des Mundraums erfolgt aber nicht nur durch Beteiligung am oralen Biofilm, sondern P.g. kann auch lokal in parodontale Gewebe und in Epithelzellen eindringen.

Bereits in frühen Publikationen und bis heute wird *Porphyromonas gingivalis* in der Literatur als eines der maßgeblichen Pathogene bei der Entstehung der Parodontitis beschrieben (Slots et al. 1986, Lamont et al. 2000, Mysak et al. 2014). P.g. wird gemäß neueren mechanistischen Modellen als ‚keystone‘ (Brückenstein) Pathogen bezeichnet, womit seine zentrale Rolle in der Ätiologie der Parodontitis beschrieben wird, welche es auch dann ausüben kann, wenn es im Vergleich mit der gesamten Plaquemenge nur in geringer Anzahl vorkommt (Hajishengallis und Lamont 2012). Während sich bei Pathobionten die Pathogenität definitionsgemäß aus Habitatveränderungen (Umwelteinflüsse oder Veränderungen der Immunabwehr) und damit meist einem zahlenmäßigen Anwachsen der Population der Spezies ergibt (wie es z.B. bei *Tannerella forsythia* oder *Treponema denticola* der Fall ist), verursachen ‚keystone Pathogene‘ selbst den Zusammenbruch der Homöostase - oder begünstigen ihn zumindest. Ihre Aktion erfolgt also zeitlich gesehen vor der der Pathobionten (Hajishengallis 2014). Dysbiose, die Verschiebung des Mengenanteils verschiedener Bakterien in der Mikrobiota zum Nachteil der Gesundheit, kann zum einen durch Einflüsse von außen (also Veränderungen beim Wirt oder der Umwelt) aber auch durch ‚keystone Pathogene‘, die auch in geringer Anzahl das homöostatische Gleichgewicht zum kippen bringen können, hervorgerufen werden (Hajishengallis 2014).

In einem Mausmodell der Parodontitis kann P.g. in ansonsten keimfreien Tieren keinen Knochenabbau auslösen, im Beisein weiterer oraler Bakterien die Mikrobiota jedoch soweit verändern, dass der Knochenabbau vorangetrieben wird (Hajishengallis et al. 2011). Diese Aktivität wird teilweise seinem atypischen Lipopolysaccharid (LPS) zugeschrieben, welches nicht Toll-like Receptor 4 (TLR4) sondern TLR2 aktiviert und TLR4 in Abhängigkeit vom lokalen Entzündungsstatus sogar inhibiert, was zu einer lokalen Schwächung des Immunsystems führt (Su et al. 2015). P.g. hat jedoch noch weitere Mechanismen entwickelt, um selbst dem Immunsystem zu entgehen und gleichzeitig das für sich und andere pathogene Keime (u.a. des roten Komplex) günstige inflammatorische Milieu zu fördern (Singh et al. 2015). Es verursacht z.B. die Ausschüttung hoher Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6, unterdrückt aber gleichzeitig die Aktivierung des Komplementsystems und von TLRs (Singh et al. 2015). Das inflammatorische Exudat bietet eine Quelle essentieller Nährstoffe für P.g. da es z.B. Peptide und verwertbares Eisen aus haemolytischen Vorgängen, das im Metabolismus von P.g. eine große Rolle spielt, enthält (Hajishengallis 2011).

Die Mechanismen, die immunmodulatorisch und auf das Komplementsystem wirken und proteolytisch das Gewebe angreifen, sowie die Besiedlung oraler Epithelzellen erlauben, und der nachteilige Einfluss von P.g. auf die Zusammensetzung der symbiontischen Gemeinschaft der oralen Mikrobiota, der schließlich zum ‚microbial shift‘ bzw. der Dysbiose führt, stellen zum derzeitigen Wissensstand die Hauptmerkmale der Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* dar. Im Folgenden werden nun die Virulenzfaktoren von P.g. beschrieben und ihre Funktion erklärt.

5.2.2 Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis*

Da die Virulenz über die Interaktion mit der Umwelt vermittelt wird, gelten in erster Linie Proteine, die an der Zelloberfläche gebunden sind, die also als erste mit der Umwelt in Kontakt treten, sowie sekretierte Proteine als Virulenzfaktoren von Bakterien. Da die gut untersuchten Gingipain-Proteasen und ihre Biosynthese stark mit verschiedenen Aspekten der Virulenz von P.g. in Zusammenhang stehen, werden hier zunächst die Proteasen von P.g. und dann erst strukturgebende Elemente wie Kapsel-Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Fimbrien etc. behandelt.

Proteasen und andere Enzyme

Proteasen spielen als Virulenzfaktoren eine große Rolle. Sie werden von den Bakterien sekretiert und können durch Spaltung unterschiedlicher Substrate stark gewebsschädigend wirken. Als asaccharolytischer Organismus ist P.g. auf ein komplexes System zum Abbau von Fremdproteinen angewiesen und verfügt daher über ein breites Arsenal an proteolytisch wirkenden Proteinen.

Gingipaine (Proteolyse, Zellinvasion, Haemagglutination + Haemolyse)

Die Proteine Gingipain R (Rgp-A und Rgp-B) und Gingipain K (Kgp), die Proteine spezifisch hinter Arginin- bzw Lysinresten spalten, entfalten ihren Einfluss auf die Virulenz von P.g. durch direkte und indirekte Mechanismen in jedem Stadium der Parodontitis (Bindung und Besiedlung des Habitats, Erwerb von Nährstoffen, Umgehung der Immunabwehr des Wirtes, Penetration von Geweben und Vermehrung). In erster Linie geschieht dies dadurch, dass sie zahlreiche an der Virulenz beteiligte bakterielle Proteine prozessieren, die zum Beispiel am Fimbrienaufbau beteiligt sind oder auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Sie greifen den Wirtsorganismus proteolytisch an, werden durch dessen Proteasen aber kaum inhibiert. Hierbei werden zum einen Nährstoffe für das Bakterium freigesetzt, gleichzeitig aber auch wichtige, normalerweise eng kontrollierte Signaltransduktionswege des Wirtes dysreguliert (Kadowaki et al. 2000, Fitzpatrick et al. 2009).

Gingipaine spielen zunächst in der Zell- und Gewebepenetration eine entscheidende Rolle und entsprechende Deletionsmutanten zeigen ein stark verringertes Penetrationspotential (Andrian et al. 2004). Das lysin spezifische Gingipain K (Kgp) baut sehr effektiv Fibrinogen

und Fibrin ab (und trägt dadurch zur Blutungstendenz bei). Die Arginin spezifische Protease Gingipain A (Rgp-A) aktiviert Gerinnungsfaktoren und degradiert Fibrinogen/Fibrin durch seine für Phospholipide und Fibrinogen hochaffine Adhäsions/Hämagglutinations-Domäne (effizienter als Rgp-B). P.g. attenuiert außerdem durch proteolytische Effekte der Gingipaine den PI3K/Akt Signalweg was zur Dysregulation PI3K/Akt-abhängiger Zellfunktionen und in Folge zur Zerstörung von Epithelialbarrieren führt (Nakayama 2015).

Auf der Bakterienzelloberfläche bilden Rgp-A und Kgp große, multifunktionale Komplexe, die Funktionen wie Proteolyse, die Gewinnung von Hämoglobin, Aktivierung von Blutplättchen, Agglutination von roten Blutkörperchen, Hämolyse und Adhäsion an die extrazelluläre Matrix bewerkstelligen (Olsen et al. 2014). Dies ist in Einklang mit Beobachtungen aus dem Mausmodell der Parodontitis, wo RgpA und Kgp, nicht jedoch Rgp-B, eine maßgebliche Rolle im Pathogeneseprozess der Parodontitis spielen (Pathirana et al. 2007). Gingipaine können in solchen - durch Lipopolysaccharide (LPS) an die Oberfläche gebundenen - Formen vorkommen, jedoch auch abgespalten und in die Umgebung freigesetzt werden (Olsen et al. 2014).

Gingipaine aktivieren das Kininsystems (Kininogen/ Kallikrein/ Kinin-System (Rapala-Kozik et al. 2011), indem die sich auf der Bakterienoberfläche bildenden (und oben beschriebenen) Adhäsionspatches (bestehend aus Gingipainen mit Hämagglutinin/Adhäsion-Domänen) Bestandteile des Kininsystems binden. Auch Fibronectin und Laminin (Glykoproteine der extrazellulären Matrix) werden gebunden und abgebaut (Lantz et al. 1991, Pike et al. 1996). Gingipaine stimulieren die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in Fibroblasten und aktivieren sekretierte latente MMPs, welche das parodontale Gewebe zerstören können (Imamura et al. 2003). Potempa et al. (2000) beschreiben den großen Einfluss von Gingipainen auf den Kontrollmechanismus der MMPs auf der Ebene der Gen- und Zymogenaktivierung.

Gingipaine sind auch am Abbau des Makrophagen-Oberflächenrezeptors CD14 beteiligt, was die LPS-vermittelte Leukozytenaktivierung inhibiert, und dadurch die Besiedlung durch P.g. erleichtert (Imamura et al. 2003). Gingipaine stören außerdem die Funktion neutrophiler Granulozyten und führen zur Inaktivierung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und der Modifizierung von Elastase (Jagels et al. 1996, Calkins et al. 1998, Abrahamson et al. 1997). Die Multifunktionalität der Gingipaine erklärt den in seiner Virulenz völlig abgeschwächten Phänotyp der Gingipain-negativen Mutanten von *Porphyromonas gingivalis* (Palm et al. 2015).

Unter Verwendung eines modifizierten Zellinvasionsassays konnte demonstriert werden, dass verschiedene Subtypen innerhalb einer Population von P.g. Stämmen Unterschiede in

ihrer Fähigkeit, in orale Epithelzellen einzudringen, aufweisen (Suwannakul et al. 2010). Der hochinvasive Subtyp dringt hierbei 10-30x so effizient ein wie der schlecht invasive Subtyp. Eine Analyse der Gingipain Aktivität dieser Subtypen ergab, dass bei der hochinvasiven Art die zellassozierte Rgp-Aktivität reduziert war.

Klinisch manifestiert sich die Aktivität der Gingipaine in der Ausbildung von Ödemen durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Kallikrein/Kinin Signalwegaktivierung durch Rgp), Infiltration von neutrophilen Immunzellen (Aktivierung des Komplementsystems durch Rgp) und Blutung (Abbau von Fibrinogen/Fibrin durch Kgp) (Imamura et al. 2003, Travis et al. 1997).

Neben den Gingipainen selbst sind für die Virulenz von P.g. natürlich auch in die Gingipainsynthese involvierte Faktoren maßgeblich. Die Acetyltransferase VimA (virulence modulating) von P.g. beispielsweise spielt eine Rolle in der Resistenz gegenüber oxidativem Stress, was wichtig ist bezüglich der harschen inflammatorischen Lebensbedingungen in der parodontalen Tasche (Aruni et al. 2013). VimA ist außerdem mit für den pigmentierten Phaenotyp von P.g. verantwortlich (Vanterpool et al. 2005). VimA moduliert die Gingipain Biogenese und hat daher indirekten Einfluss auf dessen virulente Aktivität. Es beeinflusst außerdem die Glykosylierung und damit Verankerung von Gingipainen und spielt auch bei der Sialinisierung, im Acetyl-Coenzym A Transfer, im Lipid A Metabolismus und in anderen Bereichen der Proteinbiosynthese eine Rolle. Die posttranslationale Modifikation verschiedener Oberflächenbestandteile stellt ein Schlüsselement bei der Modulation des pathogenen Potentials von P.g. dar. Der Reifungsprozess der Gingipaine steht mit der Kohlehydrat-Biosynthese in Verbindung und wird neben VimA durch weitere Proteine (VimE, VimF, Por, PorR, Sov und Rfa) reguliert (Aruni et al. 2013). Das ‚Por‘- Sekretionssystem aus PorT, Sov, Pg27 sowie weiteren P.g. Proteinen vermittelt den Transport und die Sekretion von Gingipainen und auch von anderen P.g.-Proteinen, die ebenfalls verwandte Export-Domänen besitzen (Sato et al. 2010). Es gibt weitere Proteine mit bislang wenig geklärter Funktion, die ebenfalls an der Funktion von Gingipainen beteiligt sind , z.B. PG534 (Saiki et al. 2010).

Trypsin-like proteases

Neben den Gingipainen wurden bei P.g. mehrere weitere Proteasen mit trypsin-artiger Aktivität nachgewiesen. Trypsin verdaut Proteine der extrazellulären Matrix und kann daher einen Gewebeverband schädigen, indem es die Zelladhäsion beeinträchtigt. Trotzdem spielen diese Proteine bei der Entstehung der Parodontitis keine entscheidende Rolle, da

sie durch Wirtsfaktoren weitgehend inaktiviert werden.

PPAD (P.g. Peptidylarginin-Deiminase)

Als Citrullinierung bezeichnet man einen Vorgang der post-translationalen Modifikation bei der Argininreste in Proteinen deiminiert werden. Normalerweise finden sich diese Enzyme nur bei Vertebraten, doch einzigartig unter Bakterien kodiert auch P.g. für eine Peptidylarginin-Deiminase (PPAD), die allerdings zu denen der höheren Eukaryonten genetisch keine Verwandtschaft aufweist. Ihre Funktion wird bei der Implikation von P.g. in die Rheumatoide Arthritis diskutiert, da hier Citrullinierungsprozesse pathologisch verändert sind. PPAD modifiziert andere P.g.-Proteine, jedoch auch sich selbst und Wirtsproteine (Bielecka et al. 2014, Goulas et al. 2015).

Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV)

Aminosäuren werden von P.g. als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt und sie werden in erster Linie in Form von Dipeptiden eingebaut, welche durch Dipeptidylpeptidasen (DPP) zur Verfügung gestellt werden. Die am besten charakterisierte DPP von P.g., DPP-IV, hat selbst keine Gelatinase oder Kollagenase-Aktivität gegenüber humanem Kollagen, kann jedoch MMP's (Matrix-Metalloproteinasen) des Wirtsorganismus (MMP1 = Kollagenase, MMP2 = Gelatinase,) die eine große Rolle in späten Stadien der Parodontitis spielen, aktivieren. Es konnte eine Korrelation zwischen der Fähigkeit von P.g. Stämmen, Biofilme auszubilden, und der DPP-IV Aktivität festgestellt werden (Clais et al. 2014). In einem Mausmodell der subkutanen Abszessbildung stellten sich die biofilmbildenden Isolate mit hoher DPP-IV Aktivität als pathogener heraus als die nicht-biofilmbildende Stämme mit niedriger DPP-IV Aktivität, die keine Abszesse bildeten. Der Zusammenhang zwischen DPP-IV Aktivität und der Bildung von Biofilmen ist jedoch nicht geklärt. Beide Faktoren werden jedoch als mögliche Ansätze von Therapien diskutiert (Krauss et al. 2000). Mittlerweile wurden weitere DPP (DDP-7, DPP-11) von P.g. identifiziert und charakterisiert (Banbula et al. 2001, Ohara-Nemoto 2011).

GroEL

Das GroEL Protein induziert bei Parodontitispatienten hohe Antikörper-Titer und wurde

daher in seiner Funktion näher untersucht. Es handelt sich um ein Protein aus der Hsp60 Familie, die an Proteinfaltungsprozessen beteiligt sind und schnell auf Stressreaktionen reagieren (heat-shock Proteine). Es zeigte sich, dass Inkubation von humanen parodontalen Ligamentzellen mit rekombinantem GroEL zur Ausschüttung von Zytokinen (IL-6, IL-8) führt, die mit vermehrter Knochenresorption in Zusammenhang stehen. Außerdem fördert GroEL bedingt durch Zytoskelett-Reorganisation die Zellmigration. Es wird vermutet, dass GroEL durch die Aktivierung des Faktors RANKL, an der Osteoklastogenese beteiligt ist. Im Rattenmodell zeigten sich verstärkte Entzündungsreaktionen und Knochenschwund nach einer GroEL Inokulation. Forscher vermuten, dass die Immunantwort auf Stress-assoziierte Proteine eine Entzündungsantwort hervorruft, die schließlich zu einer Chronifizierung führen kann (Lin et al. 2014).

Kapsel / Polysaccharide und Lipopolysaccharide

Bakterielle Zelloberflächenglykane wie Polysaccharide und Lipopolysaccharide der Kapsel beeinflussen den Prozess der Wirts-Immunantwort auf den pathogenen Reiz und werden daher als Schlüsselemente der Virulenz definiert. P.g. exprimiert zumindest drei Oberflächenglykane, O-LPS, A-LPS und K-Antigen. K-Antigen Kapseln sind phagozytose-resistent, während nicht kapselbildende Stämme besser in Epithelzellen eindringen und dort replizieren können (Laine et al. 1998, Irshad et al. 2012). Die bakterielle Kapsel verhindert den Zugang des Immunsystems zum Bakterium und kann die Anwesenheit des Bakteriums auch maskieren. Ein P.g. Phänotyp ohne Kapsel induziert wesentlich höhere Mengen an inflammatorischen Zytokinen, was die Kapselbildung zu einem Faktor der Unterwanderung des Immunsystems macht (Brunner et al. 2010). Andererseits zeigten sich in einem Tiermodell kapselbildende Stämme virulenter als nicht-kapselbildende (Van Steenberg et al. 1987).

Lipopolysaccharide (LPS), strukturgebende komplexe Glykanstrukturen auf der Bakterienoberfläche, die durch Lipide in der Zelle verankert sind, wirken normalerweise stark immunogen und die ‚innate immunity‘ (natürliche, nicht-adaptive Immunität) der Wirtsorganismen reagiert spezifisch auf Kontakt mit bakteriellen LPS (toll-like receptors (TLR)-Aktivierung). Bei P.g. finden sich wie oben erwähnt O- und A-Typ LPS, die auch die Serotyp-Spezifität der P.g.-Stämme determinieren (Sims et al. 2001). Bei P.g. scheint es sich jedoch um atypische LPS zu handeln, die hauptsächlich TLR2, aber auch TLR4 Rezeptoren stimulieren (auch Fimbrien, Lipoprotein PG1828 und Phosphoceramide sind potentielle

Kandidaten in P.g., die eine solche Antwort hervorrufen können) und in Makrophagen nur eine im Vergleich zur Stimulation mit *Escherichia coli* LPS transiente Immunreaktion hervorrufen (Holden et al. 2014, Sellers et al. 2015). Die von den Immunzellen produzierten Zytokine haben einen schädigenden Effekt auf den Alveolarknochen und sind am Knochenabbau beteiligt, während sie keinerlei Effekt auf das Weiterbestehen der P.g. Infektion haben (Burns et al. 2006, Liang et al. 2011). Das LPS von P.g. kann in dendritischen Zellen Reifung und antigenpräsentierende Funktionen initiieren und es regt die Bildung von Osteoklasten an, indem es TLR2-abhängig RANKL Expression induziert (Kassem et al. 2015).

Eine *in vivo*-Relevanz der Beobachtung, dass P.g. LPS in gingivalen Fibroblasten TLR4 Signalwege stimuliert, hat sich hingegen bislang noch nicht nachweisen lassen können (Wang et al. 2000).

Adhärenz /Adhäsionsmoleküle

Fimbrien

Fimbrien sind hitzebeständige Filamente von etwa 5 nm Durchmesser und 0,3 bis 3 µm Länge, die aus 41 bis 49 kDa großen Fimbrillin-Untereinheiten bestehen und für P.g. den wichtigsten Faktor für die Adhärenz darstellen. Durch sie ist die Bindung am Substrate wie Epithelzellen, Speichelmoleküle, Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen, das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin, Laktoferrin aber auch an andere Bakterien (Auto- sowie Koaggregation) möglich.

Der *fim*-Gencluster besteht aus 7 Genen: FIMX, *Porphyromonas gingivalis* outer membran protein A gene (PGMA) und fimA-E. Das strukturelle Molekül ist hierbei FimA (auch Fimbrillin genannt) und die P.g.-Fimbrien bestehen ausschließlich aus FimA-Molekülen. Es ist bekannt, dass die P.g.-Stämme ATCC 33277 und 381 (33277) aberrant lange Fimbrien (über einige µm in der Länge) exprimieren, was auf FimB Mangel zurückzuführen ist. Tatsächlich scheinen die Proteine FIMX, PGMA und FimB bis FimE nur regulatorisch auf die Fimbrienbildung einzuwirken – und zwar sowohl bezüglich der Menge als auch der Länge - ohne für die Ausbildung der Fimbrien jedoch essentiell notwendig zu sein (Nishiyama et al. 2007, Wang et al. 2007, Nagano et al. 2010). Es zeigte sich für verschiedene fimA-Genotypen, dass in gesunden Probanden häufig Genotyp I und V gefunden wird, während bei Parodontitis-Patienten die Typen II und IV dominieren, was eine starke Implikation der Funktion der Fimbrien in die Pathogenese der Parodontitis belegt (Amano et al. 2000, 2010). Auf der Oberfläche von P.g. werden auch kürzere Fimbrien, welche aus dem Protein Mfa

(auch als MFA1 bezeichnet) bestehen, exprimiert (Amano et al. 2010), welche nur in Abwesenheit der längeren Fimbrien sichtbar gemacht werden können, und die so zuvor unentdeckt geblieben waren. Beide Typen scheinen bei der Entwicklung der Parodontitis eine Rolle zu spielen (Amano et al. 2004)

P.g. ist in der Lage, mit verschiedenen oralen gram-positiven und-negativen Spezies zu ko-aggregieren (Whittaker et al. 1996). Die Länge der Fimbrien definiert, dass sie die ersten Bestandteile der Bakterienzelle sind, die mit anderen Bakterien und auch mit Wirtszellen interagieren. In der Literatur wird berichtet, dass die langen Fimbrien von P.g. die Ko-adhäsion mit einer Anzahl oraler Mikroorganismen vermitteln: *Actinomyces viscosus*, *Treponema denticola* (Dentilislin), *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus oralis* (beide über das zentrale Glykolyse-Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase / GAPDH) (Hashimoto et al. 2003, Park et al. 2005, Goulbourne et al. 1991, Maeda et al. 2004, Amano et al. 2010). Kurze Fimbrien von P.g. ko-adhärieren mit *Streptococcus gordonii* mittels Adhäsion-Rezeptor-Interaktion und mit *Streptococcus*-SspA und -SspB Oberflächenproteinen. (Kuboniwa et al. 2010). Lange Fimbrien scheinen sowohl bei der Ausbildung des Biofilms als auch bei seiner Reifung eine Rolle zu spielen, während kurze Fimbrien und Kgp (das lysin-spezifische Gingipain) suppressive und regulatorische Rollen während der Biofilmentwicklung haben (Kuboniwa et al. 2009). Darüber hinaus steuert Rgp (das Arginin-spezifische Gingipain) die Morphologie und das Biovolumen der Mikrokolonie. Gemeinsam scheinen diese Moleküle in einer koordinierten Art und Weise zu handeln, um die Entwicklung des reifen Biofilm zu regulieren.

TLRs (T-cell lymphotropic receptors, Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen) co-clustern mit CD14, CD36, CD55 (den Zerfall beschleunigender Faktor), Komplement Rezeptor 3 (CR3; CD11b/CD18), CXC-Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4) und Wachstumsdifferenzierungsfaktor 5 (GDF5) (Hajishengallis et al. 2006, Asai et al. 2001). Bei langen Fimbrien wurde gezeigt, dass sie nuclear factor-kappaB (NF- κ B) mittels TLR2 und CD14 stimulieren, was zu einer Induktion von Zytokinen führt, die - wie auch TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-6 - an der Knochenresorption beteiligt sind (Hajshengallis et al. 2006, Asai et al. 2001, Ogawa et al. 2002, Davey et al. 2008, Harokopakis et al. 2006). Obwohl CD14 ein wichtiger Co-Rezeptor für die Aktivierung von Epithelzellen durch lange Fimbrien ist, wurde festgestellt, dass die Cytokin-Reaktionen (IL-6, IL-8, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, und TNF- α) von primären gingivalen Epithelzellen auf P.g. moderat sind. Ein Effekt der durch den Mangel an membranassoziiertem CD14 auf diesen Zellen zurückzuführen ist (Hajishengallis et al. 2006, Eskan et al. 2007). Im Gegensatz dazu reagieren Monozyten mit CD14 stark auf lange Fimbrien und sekretieren große Mengen von

IL-6, IL-8 und TNF- α (Eskan et al. 2007). Lange Fimbrien induzieren auch IL-1 β , IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) und E-Selectin in menschlichen Endothelzellen der Aorta (Takahashi et al. 2006). Obwohl lange Fimbrien nur eine von mehreren pro-inflammatorischen Molekülen von P.g. sind, zeigten Mutanten ohne lange Fimbrien im Vergleich deutlich schwächere Zytokin-Antworten, was möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die langen Fimbrien wohl zuerst mit den Wirtszellrezeptoren interagieren, was die unmittelbare Aktivierung intrazellulären Signalkaskaden zur Folge hat (Kato et al. 2007).

Andere Studien zeigen, dass kurze Fimbrien stark in Wechselwirkung mit CD14 und TLR2 (aber nicht TLR4) stehen. Sie induzieren die Expression von Zytokinen (IL-1 α , IL- β , IL-6 und TNF- α) sowohl in menschlichen Monozyten-Zelllinien als auch in Makrophagen der Maus (Hamada et al. 2002, Hiramane et al. 2003).

Lange Fimbrien interagieren außerdem mit CXCR4, einem Ko-Rezeptor für die TLR2 Aktivierung in menschlichen Monozyten und Makrophagen der Maus. Sie induzieren die CXCR4-vermittelte Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, die wiederum die TLR2-induzierte NF- κ B-Aktivierung hemmt (Hajishengallis et al. 2008, Pierce et al. 2009).

Die Bedeutung der Fimbrien wird deutlich in einem Experiment, in dem durch Immunisierung von Ratten alleine mit isolierten Fimbrien eine pathogene Wirkung der P.g.-Infektion unterdrückt wurde. P.g. Mutanten, die nicht zur Ausbildung von Fimbrien in der Lage sind, zeigen außerdem einen drastisch verminderten Pathogenitätsphänotyp hinsichtlich der Zerstörung des Alveolarknochens. Ein P.g. Stamm der keine Fimbrien exprimiert zeigt außerdem eine signifikant bessere Bildung von Fibronectin (Evans et al. 1992, Malek et al. 1994, Puschmann 2004).

Hämagglutinine (Hämagglutination und Hämolyse)

Auf der Oberfläche von P.g. werden mehrere Proteine mit hämagglutinierender Funktion exprimiert, die ebenfalls an der Zelladhäsion beteiligt sind und auch den Prozess der Kolonie- bzw Biofilmbildung durch Quervernetzung mit humanen Zellbestandteilen unterstützen (Lamont und Jenkinson 1998).

Eisen spielt beim Wachstum und der Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* eine entscheidende Rolle. Da Eisen in Form von Hämin einen essentiellen Nahrungsbestandteil von P.g. darstellt, hat das Bakterium Mechanismen entwickelt, um an die Oberfläche von Erythrozyten zu binden und Hämin daraus freizusetzen. Wie oben beschrieben besitzen

manche Gingipaine funktionelle Hämagglutinations-Domänen und damit hämagglutinierende Eigenschaften. P.g. besitzt jedoch auch weitere Hämagglutinine, die durch die Gene hagA, hagB und hagC codiert werden. Deren Deletion schwächt den HA Phänotyp von P.g., inhibiert ihn aber, wegen der Redundanz dieser Aktivität in verschiedenen Proteinen, nicht (Lepine und Progluske- Fox 1996). Auch Lipopolysaccharide und Fimbrienproteine können für einen Hämagglutinationsphänotyp verantwortlich sein (Ogawa und Hamada 1994). Hämagglutination und proteolytische Prozesse scheinen durch Ko-expression in engem Zusammenhang miteinander und zu Adhärenz und Fimbrienaktivität zu stehen (Lamont 1998).

Invasion und Besiedlung von Epithelzellen

Nach Bindung an die Zellmembran wird P.g. über lipid rafts internalisiert und gelangt in frühe Phagosomen. Es muss dann von P.g. ein Prozess der zellulären Autophagie initiiert werden, da P.g. sonst in Phagosomen abgebaut wird. (Belanger et al. 2006, Mysak et al. 2014). Im Laufe des Autophagieprozesses entstehen für P.g. optimale Ernährungs- und Wachstumsbedingungen in der Epithelzelle (Belanger et al 2006). Es ist noch unklar, durch welche Mechanismen und bakterielle Faktoren dieser Prozess abläuft.

Integrine sind für die Ausbildung der epithelialen Barriere essentiell, weil sie durch sogenannte 'focal adhesions', lokale Adhäsionspunkte, die physikalische Verbindung zwischen dem intrazellulären Zytoskelett und der extrazellulären Matrix vermitteln. Sie beeinflussen außerdem u.a. Prozesse der Zellproliferation und Motilität aber auch der Wundheilung und Regeneration (Gumbiner 1996). Bei diesen Ereignissen spielen die Proteine Paxillin und Focal Adhesion Kinase (FAK) eine wichtige Rolle und die Phosphorylierung von FAK ist ein zentraler Regulator bei der Integrin-vermittelten Zellmigration (Schlaepfer et al. 1999). Paxillin findet sich konzentriert an 'focal adhesions' und spielt eine Rolle bei der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts (Nakamura et al. 2000). Das Eindringen von P.g. in Epithelzellen führt zur Herabregulierung von Paxillin und FAK, was zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktion und Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts führt. Gingivale Fibroblasten und Epithelzellen, welche mit P.g. infiziert sind, zeigen eine reduzierte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix. Veränderungen in der Morphologie von einer ausgebreiteten zu einer abgerundeten Form und die damit beeinträchtigte Motilität nach Inkubation mit P.g. wurden bereits von mehreren Gruppen beschrieben, was auf oben beschriebene zytoskelettale Veränderungen zurückzuführen ist (Yilmaz et al. 2003). Durch

P.g. induzierte Apoptosisvorgänge resultieren allerdings ebenfalls in einem Abbau von Aktin und führen zu einem Kollaps des Zytoskeletts. Zhang et al. (2013) berichten über die Invasion von P.g. in Osteoblasten mittels Bindung der $\alpha 5\beta 1$ -Fimbrien an Integrin auf Osteoblasten und anschließender Kondensation von peripherem Aktin. In den infizierten Zellen wurde über den Signaltransduktionsweg der JNK-Kinase Apoptose induziert, ein Prozess, der für die Bakterien jedoch nachteilig ist (Zhang et al. 2013). Auch Gingipaine können die Zellintegrität modifizieren (Chen et al. 2001, Sheets et al. 2005, Tamai et al. 2005, Kinane et al. 2012).

Am Invasionsprozess sind auch Fimbrienproteine beteiligt (s.o.). Fimbrien erleichtern über zellassoziertes Fibronectin und dem an Fibronectin bindenden $\alpha 5\beta 1$ -Integrin die bakterielle Invasion von mehreren humanen epithelialen Zelllinien und die Persistenz von P.g. an intrazellulären Orten in vitro, was den Erreger vor der Erkennung durch das Immunsystem schützen und seiner weiteren Ausbreitung in benachbarte Gewebe dienlich sein kann (Yilmaz et al. 2002, 2003, 2004, Tsuda et al. 2008).

Verschiedene Subtypen von P.g. zeigen Unterschiede in ihrer Fähigkeit, in orale Epithelzellen einzudringen (Suwannakul et al. 2010). Nach Veening et al. (2008) resultiert diese epigenetische Veränderung in der Entstehung von phänotypischen Merkmalen, die sich als Unterarten innerhalb einer isogenen Bevölkerung manifestiert, in der eine solche Variation einen Mechanismus bietet, um eine schnelle Auswertung der ökologischen Chancen oder die Reaktion auf Belastungen zu manifestieren ("bet-hedging"). Eine Analyse ergab eine Reihe von Genen, die in die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und in den Eisentransport involviert sind, und die entscheidend für das Eindringen und das Überleben in Epithelzellen sein könnten. P.g. exprimiert außerdem eine Reihe von Proteinen, die zum sogenannten 'caseinolytischen System' (Clp) gehören. ClpC und ClpXP scheinen dabei für das Eindringen in Wirtsepithelzellen notwendig zu sein, ClpB spielt hierbei hingegen keine Rolle (Capestani et al. 2008)

Auto- und Ko-aggregation, Ausbildung von Biofilmen

In die Bindung an andere Vertreter der gleichen Spezies (Autoaggregation) und Vertreter anderer Spezies (Ko-Aggregation) sind bei *Porphyromonas gingivalis* in erster Linie die Fimbrien involviert. Die langen Fimbrien initiieren dabei die Entstehung des Biofilms, während sie die Reifung des Biofilms nicht vorantreiben. Kurze Fimbrien und das Gingipain Kgp haben suppressive und regulatorische Rollen während der Entwicklung des Biofilms.

Das Gingipain Rgp hingegen bestimmt die Morphologie der Kolonie in einem Versuchsansatz und auch deren Volumen. Diese Faktoren scheinen gemeinsam an der Regulation der Biofilmentwicklung beteiligt zu sein (Kuboniwa et al. 2009).

An der Ko-Aggregation mit anderen Bakterien sind auf der Seite von P.g. ebenfalls Fimbrien und Gingipaine wichtig (Haraguchi et al. 2014). Bei der Ko-Aggregation von P.g. mit T.d. ist das Protein Dentilisin beteiligt, und an der Ko-Aggregation mit Vertretern anderer Spezies, die nicht zum roten Komplex gehören, sind auf deren Seite zahlreiche weitere Faktoren bekannt, die am Aggregationsprozess beteiligt sind (Sano et al. 2014).

Interaktion mit dem Komplementsystem

Das Komplementsystem als Bestandteil der natürlichen Immunität des Wirtsorganismus (innate immunity) ist ein schnell aktivierbares Verteidigungssystem gegen eindringende Mikroben. Die Aktivierung des Komplementsystems resultiert in einer Art von Kettenreaktion von proteolytischen Vorgängen, die jeweils auf den nächsten Faktor aktivierend wirken. In diesem Prozess werden die Mikroorganismen von Komplementbestandteilen bedeckt (opsonisiert) und letztendlich werden Immunzellen dadurch herbeigelockt und aktiviert. Die Eindringlinge werden phagozytiert und lysiert (Markiewski und Lambris 2007).

Das Komplementsystem rekrutiert und aktiviert Zellen des Immunsystems und ist damit ein Schlüsselfaktor bei der Pathogenabwehr. Es steht mit der Entwicklung der Parodontitis in engem Zusammenhang: Überreaktion (durch z.B. Gendefekte) oder Dysregulation (durch pathogene Faktoren) tragen zum Entzündungsverlauf maßgeblich bei und parodontale Entzündung und lokale Aktivierung des Komplementsystems korrelieren in histologischen und klinischen Untersuchungen.

Es existieren drei unterschiedliche Signalwege bei der Komplementaktivierung, sie alle enden jedoch (nach Aktivierung von signalweg-abhängigen Konvertasen) zunächst am gleichen zentralen Schlüssel-Punkt, dem C3 Faktor. Dieses so zentrale Protein wird jedoch direkt durch alle drei P.g. Gingipaine angegriffen (Popadiak et al. 2007). Durch Gingipain-vermittelten C3-Abbau inhibiert P.g. maßgeblich dessen Aktivierung, und zwar unabhängig davon, welcher der Signalwege genutzt wird. Die Opsonisierung und Bindung des MAC (membrane attack complex) an der Bakterienoberfläche wird also durch Gingipaine unterdrückt (Popadiak 2007). Außer C3 degradiert P.g. auch die Komplementfaktoren C1, C4 und C5 und fängt das C4b Protein ab (Wang et al. 2010). Während der massive Abbau und die Inaktivierung von Komplementbestandteilen dem ohnehin komplement-resistenten

Bakterium wenig Vorteile bringt, verbessert es jedoch die Lebensbedingungen für andere, vielleicht komplement-sensitivere Bakterien (Hussain 2015).

Ein wichtiger Bestandteil der innate immunity sind außerdem sogenannte ‚pattern recognition receptors‘ (PRR) wie z.B. die Familie der ‚toll-like receptors‘ (TLR, s.o.). Sie detektieren konservierte mikrobielle Strukturen wie z.B. die Lipopolysaccharide der gram-negativen Bakterien und reagieren auf den Kontakt (Medzhitov 2007). In engem Zusammenspiel mit den TLRs vermittelt das Komplementsystem auch zwischen der natürlichen und der adaptiven Immunität. Um eine persistierende oder chronische Infektion zu etablieren besteht für Mikroorganismen eine wichtige Evolutionsstrategie darin, einen Weg finden, dieses System zu überlisten oder sogar für die eigenen Zwecke auszunutzen (Krauss et al. 2010).

Ein anderer Bestandteil der Komplementkaskade ist der C5a-Rezeptor, der teilweise im Zusammenspiel mit dem TLR2 wichtige inflammatorische und antimikrobielle Funktionen vermittelt. P.g. besitzt selbst eine konvertaseartige Aktivität, kann C5a daher selbst aus dessen Vorläufer generieren. Dies erscheint biologisch gesehen kontraproduktiv, da C5a ein sehr potenter Aktivator des Komplementsystems ist (Wang et al. 2010). Das durch P.g. hergestellte C5a aktiviert jedoch lokal den C5aR und stimuliert dadurch intrazelluläre Ca⁺⁺-Signalwege, die synergistisch die ansonsten schwachen cAMP Antworten der P.g.-induzierten TLR2 Aktivierung verstärken. Die erhöhte cAMP Produktion wirkt wiederum auf die Proteinkinase A (PKA), die infolge die Glykogen-Synthase Kinase 3b inaktiviert und daher NO-vermittelten Angriff auf P.g. verhindert (Hajishengallis et al. 2008, Wang et al 2010). Ebenso befremdlich erscheint auf den ersten Blick die präferentielle Nutzung des TLR2 Rezeptors durch P.g. obwohl TLR4 normalerweise bakterielle LPS erkennt (Wang et al. 2010). Allerdings hat P.g. Wege gefunden, um TLR4 auf Umwegen zu inhibieren und nur ein gewisser Teil der TLR2 Mechanistik wird inhibiert, so dass Signalwege, die für das Wachstum des Bakteriums förderlich sind unterstützt werden, während solche, die ihm schaden, inhibiert werden (Coats et al. 2009, Hajishengallis et al. 2012). TLR2- sowie C5aR-defiziente Mäuse zeigen nach P.g. Infektion nicht den Knochenabbau-Phänotyp des P.g. Wildtyp, was in vivo zeigt, dass dieser Pathogeneseprozess auf dem Zusammenspiel von TLR2 und C5aR beruht (Raby et al. 2011). Von besonderem Interesse dabei ist die spezifische Inhibition von IL-12p70, das durch TLR2 induziert wird, während durch die Interaktion von C5aR und TLR2 weiterhin die Bildung proinflammatorischer und dem Knochenabbau dienlicher Zytokine (IL-1b, IL-6 und TNF-α) angeregt wird. In vivo kann P.g. erwiesenermaßen einer Elimination durch IL-12p70-abhängige Mechanismen entgehen, während es gleichzeitig den Knochenabbau begünstigt, und damit gleichzeitig destruktive

Entzündungsprozesse fördern und trotzdem für das eigene Überleben sorgen kann (Raby et al. 2011). Dieser ausgeklügelte Mechanismus ist für P.g. von Vorteil, denn eine generalisierte Immunsuppression herbeizuführen wäre nicht im Interesse von P.g.. Die Attacke durch Leukozyten könnte so vielleicht verhindert werden, andererseits könnte das Bakterium durch fehlende Exudatbestandteile schlicht verhungern: als asaccharolytischer Organismus braucht es das proteinreiche, inflammatorische Milieu um zu gedeihen (Hajishengallis und Lambris 2012).

Die langen Fimbrien von P.g. sind ebenfalls an der Subversion des Komplementsystems beteiligt, indem sie mit CR3 interagieren (Hajishengallis et al. 2007). Die CR3-Aktivierung vermittelt wie oben beschrieben das Zusammenspiel von TLR2 und IL-12p70, und damit fördert dieser Prozess das Überleben von P.g. in vitro und in vivo (Hajishengallis et al. 2011). Die gleiche Gruppe zeigte auch, dass *P. gingivalis* die zellvermittelte Immunität unterdrückt, indem es die Menge von ausgeschüttetem Interferon (IFN)- γ , einem Aktivator der zellvermittelten Immunität, herabreguliert (Hajishengallis et al. 2011). P.g. manipuliert also die Bestandteile des Komplementsystems in seinem Sinne um der Immunerkennung zu entgehen, die ökologische Nische erfolgreich zu besiedeln und die lokale Mikrobiota zu verändern.

Vesikel

Porphyromonas gingivalis kann Vesikel (extrazelluläre Vesikel, ECV) von der äußeren Membran absondern, die aufgrund ihrer geringen Größe (20 – 150 nm) leicht das umliegende Gewebe penetrieren und so auch zu einer lokalen Gewebszerstörung führen können (Kamaguchi et al. 2003, Mayrand et al. 1988). Vesikel können als Vehikel für toxische Substanzen und zahlreiche proteolytische Enzyme dienen (Mayrand et al. 1988). Es wurde gezeigt, dass ca. 80% der wichtigsten toxischen Substanzen von P.g. in die extrazellulären Vesikel inkorporiert werden können (Tsuda et al. 2005, Grenier et al. 1987). Insgesamt konnten 151 Proteine von P.g. in ECVs nachgewiesen werden (Veith et al. 2014). Pham et al. (2002) fanden in den äußeren Membranvesikeln von P.g. neben Gingipain große Mengen an Cysteinproteasen.

Vesikel können auch die spezifische Immunantwort behindern, indem sie mit Bakterienzellen um Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren, und sind an der Koaggregation mit *Eubacterium saburreum* und *Capnocytophaga ochracea* beteiligt (Grenier

et al. 1987).

Von ECVs wird außerdem die Ausschüttung von Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) sowie von Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) aus humanen parodontalen Ligamentfibroblasten angeregt, was zur Auflösung der extrazellulären Matrix führen kann (Sang et al. 2014). ECVs führen außerdem zu einer Herabregulierung von CD-14 Rezeptoren, was wiederum die Hyporeaktivität von Makrophagen auf LPS-Stimulation bewirkt, und die Immunantwort auf P.g. so schwächt (Duncan et al. 2004).

Die Vesikel können auch Gingipaine enthalten und Inkubation mit ECVs kann experimentell die Ablösung des oralen Plattenepithels bewirken (Nakao et al 2014).

Serotypen K1 und K2

Destruktive Parodontitis ist assoziiert mit einer Th1-Th17 Immunantwort und der Aktivierung von RANKL–spezifischen Osteoklasten (RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) ist ein in die Osteoklastogenese involvierter Faktor). Die Serotypen K1 und K2 von *Porphyromonas gingivalis* induzieren eine besonders starke Th1-Th17 Immunantwort und man kann bei ihnen eine im Gegensatz zu anderen Serotypen verstärkte RANKL Produktion nachweisen. Vermittelt durch die Th17-assoziierte RANKL Produktion induzieren sie eine starke Osteoklasten Aktivierung, was wiederum die Basis für eine stärkere Knochenresorption und damit eine Erklärung für die schwerere Verlaufsform der K1- und K2-assoziierten Parodontitis darstellt (Vernal et al. 2014).

Effekt von *Porphyromonas gingivalis* auf die Wundheilung

In verschiedenen Studien konnte kürzlich gezeigt werden, dass P.g. die Wundheilung deutlich verlangsamt. (Bhattacharya et al. 2014, Laheij et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Zellzyklus-assoziierte Gene, die notwendig für die Zellteilung sind, sowie Integrin-b-3 und -6, die wichtig für die Zellmigration sind, während dieses Prozesses herabreguliert werden. Dieser Nachweis deckt sich mit der früheren Beobachtung, dass P.g. die Wiederherstellung von gesundem oralen Gewebe durch Interferenz mit Zellmigration und Zellwachstum behindert (Amano et al. 2007, Furata et al. 2009). Die am beschriebenen Prozess beteiligten Faktoren sind bislang nicht eindeutig identifiziert worden, sie sind jedoch mit der Zellwand von P.g. verbunden, können ins Medium abgegeben werden und sind

hitzeresistent. Es wird daher spekuliert, dass es sich um die Fimbrien, die kapselassoziierten Polysaccharide oder die LPSs von P.g. handelt (Laheij et al. 2013).

5.3 *Tannerella forsythia*

5.3.1 Klassifikation und Charakteristika

Tannerella forsythia (T.f.), von der Gestalt her ein spindelförmiges Stäbchen, ist ein gramnegatives Bakterium mit anaerobem Metabolismus, das in die Familie der Cytophaga Bacteroides eingeordnet wurde. Es besitzt keine Fimbrien und ist unbeweglich.

Es wurde 1986 isoliert und als *Bacteroides forsythus* bezeichnet, 2006 jedoch basierend auf 16s RNA Sequenzen reklassifiziert und in *Tannerella forsythia* umbenannt (Sakamoto et al. 2002, Maiden et al. 2003, Tanner und Izard 2006, Posch et al. 2012)

T.f. kann nach den Definitionen von Socransky (Socransky 1979) als Pathogen klassifiziert werden, da es bei Parodontitis in (relativ zum gesunden Status) erhöhter Zahl vorzufinden ist (Sharma et al. 1998, Bird et al. 2001, Yoo et al. 2007), da es Hinweise auf eine Wirtsantwort gegen seine Antigene gibt, es im Tierversuch Krankheitssymptome hervorrufen kann (Takemoto et al. 1997, Sharma et al. 2005, Kesavalu et al. 2007) und es Virulenzfaktoren exprimiert die möglicherweise am Pathogeneseprozess beteiligt sind (Sharma et al. 2010, Posch et al. 2012).

T.f. besiedelt subgingivale Plaque Biofilme und besitzt eine einzigartige Glycoprotein Glucan Oberflächenschicht mit S Struktur. Die virulenten Hauptmerkmale von *Tannerella forsythia* sind Anheftung an und Invasion von Epithelzellen, der proteolytische und pro-apoptotische Angriff von Epithelzellen sowie die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine.

5.3.2 Virulenzfaktoren von *Tannerella forsythia*

Der S-layer der Zelloberfläche

„S“-Oberflächenschichten (sogenannte „S-layers“) bestehen aus wasserunlöslichen Proteinen, die die intrinsische Fähigkeit zur Selbstanordnung besitzen und auf der Oberfläche von Bakterien Netzstrukturen ausbilden. Bei *Tannerella forsythia* besteht der S-layer aus zwei Glycoproteinen, TfsA und TfsB (mit einem berechneten Molekulargewicht

von 135 bzw 154 kDa, das durch posttranslationale Modifikationen tatsächlich jedoch höher ist, die Angaben belaufen sich auf 200/210 bzw 230/270 kDa), wobei sich bedingt durch die Anwesenheit zweier unterschiedlicher Proteine eine einzigartige Struktur ergibt (Kerusou 1988, Lee 2006). Sie ist durch sogenannte ‚rough polysaccharides‘ in der Bakterienzelle verankert. Der S-layer bietet einen Selektionsvorteil für T.f. indem er einen Schutzmantel darstellt, als molekulare Sortierstation und Ionenfalle dient und Zelladhäsion, Zelloberflächenerkennung und das Anbinden von Phagen vermittelt (Beveridge et al. 1997, Sabet et al. 2003, Sara und Sleytr 2000).

Tannerella forsythia besitzt, einzigartig unter gram-negativen Prokaryoten, Glycan Core Strukturen auf der Oberfläche, die O-glycosidisch mit dem S-layer sowie mit anderen Glykoproteinen verbunden sind (Lee et al. 2006). Die O-Glycosylierung findet man ebenfalls bei mehreren anderen T.f.-Proteinen und Posch et al. (2011) postulieren hier ein Virulenzmerkmal. Ein bestimmtes Motiv in diesem Glycan Core vermag Th17-vermittelte Immunantworten (die Anlockung neutrophiler Zellen) zu supprimieren und so die Effektorfunktionen dendritischer Zellen zu modulieren. Ein Bakterienstamm ohne dieses Motiv induziert im Vergleich zum Wildtyp-Stamm vermehrt IL-23 und IL-6 Ausschüttung aus Makrophagen (Settem 2013).

Der Glycosylierungsstatus bakterieller Proteine beeinflusst auch das Potential von T.f. zur Autoaggregation. Der ORF (open reading frame) TF0022 codiert für ein Protein, das die Expression von Genen, die in Glycosylierungsprozesse involviert sind, stimuliert. Mutanten ohne diesen ORF zeigen eine verstärkte Neigung zur Autoaggregation, wahrscheinlich durch Beeinflussung der post-translationalen Modifikation von Zelloberflächenkomponenten, so dass auch hier eine virulente Komponente möglich ist (Niwa et al. 2011).

Orale Bakterien, unter anderem auch die beiden anderen Vertreter des roten Komplexes, haben verschiedene Wege entwickelt, dem Angriff durch Faktoren des Komplementsystems der natürlichen Immunabwehr im Wirtsserum zu entgehen (Serumresistenz), z.B. den Proteaseverdau von Komplementproteinen, die Rekrutierung von Faktoren, die die Komplementaktivierung inhibieren sowie die polysaccharidvermittelte Komplementinhibierung (Shimotahira et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der S-layer ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung durch Komplementfaktoren spielt. Eine Mutante mit defektem S-layer bindet große Mengen des Faktors c3b und zeigt Wachstumsstörungen in Anwesenheit von Serumproteinen (FCS, fetal calf serum). Durch den S-layer kann c3b nicht an die Zelloberfläche binden und T.f. kann in Anwesenheit von Serumproteinen besser wachsen als die S-layer-defiziente Mutante, die durch c3b-Bindung

den MAC (membrane attack complex) rekrutiert, was zu einer Zellwandperforation der Bakterien führt (Shimotahira et al. 2013).

Auch eine andere Arbeitsgruppe zeigte die Relevanz des S-layer bei der bakteriellen Unterwanderung des Immunsystems durch mRNA Expressionsprofile in stimulierten Effektorzellen. Eine T.f. Mutante ohne S-layer vermag in diesem experimentellen Ansatz die Ausschüttung hoher Mengen an proinflammatorischen Botenstoffen zu induzieren, während T.f. eine im Vergleich hierzu wesentlich verzögerte Immunantwort hervorruft (Sekot et al. 2011).

Die Daten legen nahe, dass der S-layer in der Form, wie er sich durch evolutionäre Anpassung entwickelt hat, und -vermittelt durch das Glucan Core- dazu beiträgt, dass T.f. der Kontrolle durch Mechanismen der natürlichen, angeborenen Immunität (innate immunity) entgeht und dadurch die Immunantwort des Wirtsorganismus attenuiert. Das durch die mangelhafte immunzellvermittelte Elimination bedingte Verbleiben im Wirtsorganismus erlaubt es *Tannerella forsythia*, TLR2 und Th2 Antworten zu induzieren und dadurch zur Gewebe- und Knochenzerstörung beizutragen (Settem 2013). Im Gegensatz zu *Porphyromonas gingivalis*, welches aktiv das Immunsystem vor Ort schwächt und damit aktiv auch anderen Organismen die Möglichkeit zu verstärktem Wachstum vermittelt (s.o.), handelt es sich hier jedoch um passive Mechanismen.

Sabet et al. (2001) zeigten hämagglutinierende Eigenschaften von T.f., bei der sie eine Abhängigkeit vom 210 kDa S-layer Protein demonstrierten. Diese Beobachtung konnte jedoch von einer anderen Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden und wird daher kontrovers diskutiert (Sabet et al. 2001, Murakami et al. 2002, Sakakibara et al. 2007).

T.f. kann sich an Epithelzellen der Mundhöhle anheften und in sie eindringen (Sabet et al. 2001), und in der Tat lässt sich das Bakterium in Epithelialzellen nachweisen (Rudney et al. 2005, Colombo et al. 2007). Dabei werden anti-apoptotische Mechanismen in Gang gesetzt, die den bakteriell vermittelten programmierten Zelltod blockieren. Die Zellen bieten so dem Bakterium ein Reservoir, in dem es der Immunantwort entgehen kann und so bei der Neubesiedlung nach erfolgter Therapie eine Rolle spielt (Inagaki 2006). 2001 postulierten Sabet et al., dass dieser Mechanismus der Zellinvasion durch den S-layer vermittelt wird, da er durch Präinkubation mit Antiseren gegen S-layer Proteine blockiert wurde. Die Funktionen des S-layer als äußerste Zellschicht und damit Kontaktoberfläche mit der Umwelt lassen sich nicht von den Funktionen der dort gebundenen Proteine und anheftenden Moleküle separieren. Die Änderung der Struktur des S-layer kann auch Änderungen in der Bindungsmöglichkeit anderer bakterieller Bestandteile mit sich bringen.

Alle Funktionen, die dem S-layer zugeschrieben werden, hängen folglich auch von den dort sich befindlichen und im folgenden beschriebenen Zellbausteinen ab. So weiß man mittlerweile, dass die Funktion der Anheftung zwar einen intakten S-layer erfordert (Sakakibara et al. 2007), das Eindringen in Wirtszellen jedoch durch das BspA Protein (das sich ebenfalls an der Zelloberfläche und damit am S-layer befindet) vermittelt wird (Inagaki et al. 2006).

BspA

BspA ist ein Oberflächenantigen, welches sowohl an der Zelloberfläche gebunden vorkommt als auch sekretiert wird. Es bindet an extrazelluläres Fibrinogen und Fibronectin, die im Aufbau der extrazellulären Matrix und als 'clotting factors' eine Rolle spielen. Es wirkt außerdem immunogen und bei Parodontitis Patienten werden Antikörper gegen BspA gefunden (Sharma et al. 1998).

BspA ist für Anheftung an und die Invasion von Epithelzellen nötig (Honma et al. 2001). Die Bindung von BspA an die Wirtszelle führt zur Aktivierung von PI3K und Rac1 (GTPasen der Rho-Familie) und in Folge zu Veränderungen im Aktin Cytoskelett, welche bei vielen Pathogenen eine Rolle bei der Internalisierung spielen (Inagaki et al. 2006). Weitere Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass die Internalisierung sowohl über das Molekül Clathrin als auch über sogenannte 'lipid rafts' erfolgen kann. (Mishima and Sharma 2011) Wie bereits erwähnt bietet der Prozess der Internalisierung dem Bakterium die Möglichkeit, der Immunkontrolle zu entgehen und in einem Reservoir zu ruhen, aus dem es auch nach erfolgter Therapie wieder hervortreten kann (Inagaki et al. 2006)

BspA spielt außerdem eine Rolle im Entzündungsprozess, indem es die Freisetzung sowohl von Chemokinen aus Epithelzellen als auch von pro-inflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen induziert. Dies geschieht durch die BspA-vermittelte Aktivierung des toll-like receptors 2 (TLR2), wobei der leucin-rich repeat (LRR) von BspA an TLR2 bindet und als Ligand für diesen Rezeptor zu wirken scheint. (Hajishengallis et al. 2002, Akira et al. 2004, Onishi et al. 2008, Sharma et al. 2010). Infolge der Bindung und Aktivierung kommt es im experimentellen Ansatz von Onishi et al. (2008) zur Ausschüttung von IL-8 aus humanen gingivalen Epithelzellen, in früheren Publikationen war jedoch von einer nur sehr geringen IL-8 Ausschüttung aus Primärkulturen von humanen gingivalen Epithelzellen berichtet worden (Han et al. 2000). Im Mausmodell führt Infektion mit T.f. zu parodontalem Knochenverlust (Sharma et al 2005). Mäuse ohne funktionellen TLR2 (TLR-2/-) bzw mit

Stat-6 Defizienz (Stat-6 $-/-$) zeigten hingegen deutlich eingeschränkte Suszeptibilität für T.f. –induzierten Knochenabbau sowie abgeschwächte Th2 Antworten, was darauf schließen lässt, dass Infektion mit T.f. zu einer durch TLR2-signaling vermittelten knochendestruktiven Th2-Zell Antwort führt (Myneni et al. 2011). Die BspA-vermittelte TLR2-Aktivierung stellt folglich ein starkes Virulenzmerkmal von T.f. dar.

Miropin

Miropin, ein ebenfalls von T.f. exprimiertes Serpin (= Familie von Serin-protease Inhibitoren), vermag ein weites Spektrum von Proteasen zu inhibieren. Es entwickelte sich wohl in Anpassung an die stark proteolytischen Lebensbedingungen im Mundraum und könnte neben einer putativen Funktion im Stoffwechsel des Bakteriums dadurch, dass es T.f. vor der destruktiven Aktivität neutrophiler Serinproteasen schützt, ein Virulenzpotential besitzen (Ksiazek et al. 2015).

Proteasen

Da T.f. als asaccharolytischer Organismus nicht in der Lage ist, Kohlenhydrate abzubauen, muss es Proteinbestandteile der Wirtszellen verstoffwechseln und nutzt dazu verschiedene Proteasen. Bedingt durch ihre biologische Funktion greifen die bakteriellen Proteasen jedoch auch das umliegende epitheliale Gewebe des Wirtsorganismus, sowie das Immunsystem an, da Faktoren der natürlichen / angeborenen Immunität (innate immunity) durch Abbau neutralisiert werden können.

Die in vivo Pathogenesefunktion einer bereits 1995 publizierten ‘trypsin-like serine protease’ Aktivität (Grenier 1995) eines 81kDa Proteins der Zelloberfläche ist ebenfalls als gering zu bewerten, da sie nur kleinere Proteinsubstrate spalten kann.

Die PrtH Cystein-Protease mit Hämolysin Aktivität wurde erstmals 1997 von Saito et al. (1997) beschrieben. Das für PrtH codierende Gen *prth* wurde während einer Studie zur Funktionalität verschiedener genetischer Fragmente von T.f. isoliert. Ein Klon mit dem *prth*-tragenden Genabschnitt führte in *Escherichia coli* zu Hydrolyse von Milcheiweißen. In der Sequenz wurde ein Gen identifiziert, welches für ein putatives Protein mit Ähnlichkeiten zu Cysteinproteasen kodiert, PrtH. In einer anderen Studie wurde ein Protein charakterisiert, das an der Ablösung von Zellen aus dem Verband beteiligt ist und als forsythia detaching

factor (Fdf, codiert durch das Gen *fdf*) bezeichnet wurde. Es zeigte sich, dass es sich bei prth um einen Teil des fdf Gens handelte (Pei et al. 2009). In der Literatur wird aber nach wie vor häufig der Terminus PrtH verwendet, obwohl er streng genommen nur für einen Teil des Fdf Vollängenproteins steht. PrtH zeigt strukturelle Ähnlichkeiten bzw. Sequenzhomologien mit Caspasen und den Gingipainen von *Porphyromonas gingivalis*. Die PrtH Protease (Saito et al. 1997) kann größere Proteinsubstrate spalten und damit potentiell auch zur Ablösung von Epithelzellen aus dem Gewebe führen, was mit der Freisetzung von Chemokinen (IL-8) einhergeht. Beeinträchtigung der Zelladhäsion ist als ein maßgeblicher Faktor zu bewerten, der den Prozess der Ablösung des parodontalen Gewebeverbands vom Zahnsubstrat unterstützt und damit am Fortschritt der Parodontalerkrankung und in letzter Konsequenz am Zahnverlust beteiligt ist. Auch wenn die biologischen Aktivitäten den Verdacht nahelegen, dass eine ursächliche Verbindung zur Entwicklung der Parodontitis besteht, und dies auch lange Zeit postuliert wurde, so scheint PrtH *in vivo* für ihre Entstehung zumindest nicht notwendig zu sein, da in einem gewissen Prozentsatz von Patienten Isolate ohne funktionelle PrtH gefunden wurden (van der Reijden et al. 2006)

Die kürzlich identifizierte und charakterisierte Metalloproteinase Karilysin scheint hingegen ein stark virulentes Potential zu besitzen (Karim et al. 2010). Karilysin besitzt die Fähigkeit zur Autoprozession und vermag weiterhin eine Vielzahl anderer Proteine, z.B. Fibrinogen, Fibronectin, Elastin u.a., zu spalten (Karim et al. 2010). Außerdem führt es sehr effektiv zur Ablösung des Immunfaktors TNF- α von der Oberfläche von Makrophagen. TNF- α wird teilweise von Karilysin neutralisiert, der Rest des in die Umgebung abgegebenen TNF- α behält jedoch seine biologische Aktivität und kann sowohl Apoptosis als auch autokrine Signalkaskaden proinflammatorischer Genexpression auslösen (Bryzek et al. 2014). Bereits im Jahre 2000 war gezeigt worden, dass T.f., T.f.-Lysate sowie der Zellkulturüberstand von T.f. die Apoptosis-vermittelte Zell-Lyse von HL-60 Zellen und anderen Zellen humanen Ursprungs herbeiführen (Arakawa et al. 2000). Diese Beobachtungen könnten auf Karilysinaktivität zurückzuführen sein.

Weiterhin kann Karilysin sowohl das humangenerierte, antibakterielle Peptid LL-37, welches eine bedeutsame Rolle bei der Abwehr der Besiedlung durch Pathogene im Mundraum spielt, spalten und dadurch inaktivieren als auch alle Komponenten des Komplementsystems inaktivieren, eine Funktion auf der wohl die Serumresistenz von T.f. beruht. (Koziel et al. 2010, Jusko et al. 2012)

Glycosidasen

Tannerella forsythia exprimiert eine Reihe Glycosidasen (SiaH1 und NanH Sialidasen, sowie alpha-D-glucosidase and N-acetyl-beta-glucosaminidase, (Moncla. 1990, Ishikura et al. 2003, Hughes 2003, Thompson et al. 2009) die während der Pathogenese verschiedene Rollen spielen. Ihre Aktivität liegt im Abbau von Oligosacchariden und Proteoglycanen, wodurch potentiell das Endothel der Mundhöhle angegriffen werden kann. Während des Abbauprozesses können neue Oberflächenepitope entstehen, die dem Bakterium selbst oder anderen bakteriellen Mitbesiedlern die Anheftung und Koloniebildung erlauben. Die glycosidische Aktivität führt auch zur Anhäufung eines toxischen Abfallprodukts (Methylglyoxal), das seinerseits zur Gewebeschädigung beitragen kann (Sharma et al. 2000). Das Enzym α -l-fucosidase, eine kürzlich identifizierte 51-kDa Glycosidase von T.f., scheint keine extrazelluläre Wirkung zu haben, sondern am Zuckermatabolismus im Periplasma beteiligt zu sein und somit nur eine indirekte Virulenzfunktion zu haben (Megson et al. 2015).

Lipopolysaccharide

Bei den meisten gram-negativen Bakterien befinden sich aus strukturellen und funktionellen Gründen Lipopolysaccharide (LPS) in der Außenhülle. Sie wirken immunstimulierend, indem sie von Monozyten und Makrophagen erkannt werden und dienen so dem Wirtsorganismus zum Erkennen und Bekämpfen der Infektion durch gram-negative Bakterien. In Folge des Kontakts mit LPS werden eine Reihe inflammatorischer Botenstoffe (z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 α) ausgeschüttet, die wiederum das Immunsystem dazu anregen, gegen das eindringende Pathogen vorzugehen (Posch et al. 2013). Die Lipopolysaccharidstruktur von T.f. wurde durch Massenspektroskopie teilweise geklärt. Das aufgereinigte Lipopolysaccharid vom R-Typus (*rough-type*) induziert in Makrophagen - jedoch kofaktorabhängig - die Produktion der proinflammatorischen Cytokine IL-1, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ (Posch et al. 2013).

Lipoproteine

Die Lipoprotein-Fraktion einer T.f. Aufreinigung vermochte es, unter experimentellen Bedingungen sowohl IL-6 Ausschüttung aus einer humanen gingivalen Fibroblasten-Zelllinie als auch TNF- α Ausschüttung aus Th-Zellen auszulösen. Sie induzierte weiterhin TLR2-abhängig CD25-Expression auf der Oberfläche von CD14-positiven Zellen sowie Apoptosis (Hasebe et al. 2004, Bodet und Grenier 2010). Auf diesen Beobachtungen beruht die Einordnung der Lipoproteine als Virulenzfaktoren von T.f., ohne dass diese Lipoproteine näher charakterisiert wurden. Aufgrund der redundanten Effektorfunktionen könnten hier BspA, Karilysin und Lipopolysaccharide der Zellhülle eine Rolle in der Lipoproteinfraktion spielen. Die Autoren argumentieren zumindest, dass die beobachteten Effekte nicht aufgrund von Lipopolysacchariden in der Aufarbeitung stammen. Karilysin war zum Zeitpunkt der Studie noch nicht identifiziert worden (Hasebe et al. 2004).

5.4 *Treponema denticola*

5.4.1 Klassifikation und Charakteristika

Treponema denticola (T.d.) gehört zur Familie der Spirochaetaceae. Die oralen Spirochaeten gehören der Gattung *Treponema* an, es gibt daneben die Gattungen *Borrelia* und *Spirochaeta*. T.d. ist ein gram-negatives, von der Form her schraubenförmig gekrümmtes, motiles Stäbchen. Die Fortbewegung erfolgt dabei durch Rotation um die Längsachse und die Motilität stellt einen wichtigen Virulenzfaktor von T.d. dar, da sie an der Invasion humaner Epithelzellen beteiligt ist. In einem murinen Parodontitismodell führt Inokulation mit T.d. zu Besiedlung der Mundhöhle des Tieres, Induktion einer spezifischen Immunantwort und der Herbeiführung von signifikantem Knochenabbau, was eine ursächliche Rolle von T.d. bei der Gewebszerstörung im Rahmen der Parodontitis nahelegt (Kesavalu et al. 2007). Wie *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* kann auch *Treponema denticola* an Epithelzellen binden und in sie eindringen.

5.4.2 Virulenzfaktoren

Oberflächenantigene

Die an der Oberfläche von Bakterien vorkommenden Proteine spielen eine Rolle bei der Interaktion mit dem Umfeld, insbesondere bei der Zell-Interaktion (mit anderen Bakterien oder Wirtszellen), und sind auch gleichzeitig die Angriffspunkte der antibakteriellen Immunabwehr. Bei den Bakterien des Roten Komplexes handelt es sich hier spezifischer Weise um extrazelluläre Proteasen, deren Substrate sehr vielfältiger Natur sind.

Msp

Msp ist das von der Molekülzahl häufigste Protein auf der Oberfläche von T.d. und besteht aus drei Domänen, wobei die zentrale Domäne, anders als die hoch konservierten C- und N-Termini, zwischen den verschiedenen Stämmen einen hohen Grad an Variabilität zeigen. In Tieren, die mit T.d. immunisiert wurden, finden sich verschiedene Serotypen in Abhängigkeit vom verwendeten T.d. Stamm und die variable Region ist hierfür verantwortlich (Fenno et al. 1997, Edwards et al. 2005, Lee et al. 2005, Capone et al. 2008). Es besitzt die Fähigkeit, Poren auszubilden (porin) und tritt über sog. ‚loops‘ mit einer Vielzahl extrazellulärer Proteine wie Laminin, Fibronectin, Keratin, Kollagen, Fibrinogen, Hyaluronsäure und Heparin in Kontakt, was die Besiedlung von Wirtsgewebe unterstützt (Fenno and McBride 1998, Edwards et al 2005). Msp kann, wie auch T.f. BspA, in den Aktinmetabolismus eingreifen und dadurch in aktinabhängige Prozesse eingreifen. Dies wiederum beeinträchtigt die Chemotaxis neutrophiler Immunzellen und die Aktivität von Phagozyten. (Batista da Silva et al. 2004, Puthengady et al. 2006, Amin et al. 2007, Jobin et al. 2007, Magalhaes et al. 2008). In primären gingivalen Epithelzellen löste Msp keine IL-8 Induktion aus, welches normalerweise neutrophile Immunzellen zum Infektionsherd lockt (Brissette et al. 2008). Durch Umgehung dieser Immunaktivierung könnte die Persistenz von T.d. verbessert werden.

Msp kann TLR-2 abhängig Makrophagen aktivieren und hier TNF- α Produktion auslösen (Rosen et al. 2012, Anand et al. 2013).

Td92

Ein weiteres Oberflächenprotein ist Td92, welches wohl die Bindung an Epithelzellen vermittelt, da ein Antiserum gegen Td92 diese Bindung verhindert (Jun et al. 2008). Chin et al. (2013) berichten, dass die Interferon -dominante Zytokin- Reaktion bei chronischen Parodontitispatienten beeinträchtigt war, und der Td92 -induzierte Interferon-Spiegel negativ mit der Zahnzerstörung bei Patienten assoziiert war. Die Studienergebnisse von Kim et al. (2012) legen nahe, dass Td92 die Bildung von Osteoclasten durch die Regulierung der RANKL und die Osteoprotegerin- Produktion über eine Prostaglandin E2 -abhängigen Mechanismus fördert.

TDE0471

Die putative Neuraminidase (Sialidase) TDE0471, eine oberflächenassoziierte Exo-Neuraminidase, entfernt Sialic Acid von humanen Serumproteinen. Dies dient Bakterien einerseits zur Nahrungsaufnahme, und andererseits wirkt die Anheftung von Wirtsproteinen an der Bakterienzelloberfläche dem Angriff durch das Immunsystem entgegen. TDE0471 verhindert die Bindung von MAC (membrane attack complexes) an die Bakterienzelloberfläche. Untersuchungen im Tiermodell ergaben, dass TDE0471-defiziente T.d. Mutanten in BALB/C Mäusen weniger virulent sind, als T.d.. Dieser Unterschied ist jedoch in mutanten Mäusen mit Komplementdefekten nicht gegeben, was darauf hinweist dass der virulente Phänotyp durch Unschädlichmachung des Komplementsystems entsteht (Kurniyati et al. 2013).

TDE0214

Bei TDE0214 handelt es sich um ein PilZ-like c-di-GMP bindendes Protein, das an der c-di-GMP-Signalkette beteiligt ist, und dessen Funktion wichtig ist für die Motilität des Bakteriums und seine Fähigkeit, Biofilme auszubilden. In in-vivo Mausmodellen zeigte eine Mutante ohne TDE0214 eine verminderte Invasivität des Bakteriums, eine weniger starke Fähigkeit, Abszesse zu bilden und rief eine weniger starke Immunantwort hervor, was die Funktion dieses Faktors bei der Virulenz unterstreicht.

Trypsin-like Protease Aktivität

Die Oligopeptidase B OpdB, die möglicherweise in zwei verschiedenen Formen von zwei verschiedenen Genloci exprimiert wird, verleiht T.d. eine trypsin-like Proteaseaktivität (Lee and Fenno 2004).

Lipoproteine

Zu den Oberflächenproteinen gehören viele Lipoproteine. T.d. kodiert für 166 putative Lipoproteine, die zu verschiedenen Proteinfamilien gehören, jedoch alle N-terminal acetyliert und dadurch in der Membran verankert sind (Veith et al. 2009). Die Expression der entsprechenden Gene variiert in Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten (Suspension vs. Biofilm), was die Bedeutung dieser Proteine für das Bakterium zeigt (Mitchell et al. 2010).

OppA

Das Lipoprotein OppA bindet z.B. lösliche Proteine wie Plasminogen und Fibrinogen, nicht jedoch unlösliche Proteine oder Wirtszellen. Es hat adhäsive Eigenschaften und führt möglicherweise zur Bestückung der Bakterienzelloberfläche mit Wirtszellproteinen, was die Immunerkennung verzögern oder verhindern kann (Fenno et al. 2000).

FhbB

Das Lipoprotein FhbB bindet Proteine der Faktor-H (FH)-Familie, welche regulatorisch in das Komplementsystem eingreifen. Das gebundene FH Protein wird dann durch Dentilisin gespalten und inaktiviert. Die genaue Rolle dieser Funktion bei der Virulenz von T.d. muss noch geklärt werden. Es liegt nahe, dass die Komplementfunktionen beeinträchtigt werden, aber FhbB könnte auch bei der Zellbindung und -invasion beteiligt sein (McDowell et al. 2007, 2009).

Dentilisin

Ein weiteres Lipoprotein ist die Protease Dentilisin (auch PrtP, chymotrypsin-like protease, subtilisin-like protease). Sie kommt in einem Komplex mit zwei weiteren Proteinen vor, PrcA1 und PrcA2, und trägt auf mehreren Wegen zur Virulenz von T.d. bei. Zum einen beeinflusst das Protein interzelluläre Signalwege des Wirtsorganismus, indem es Signalmoleküle wie IL-1b, IL-6, TNF-a und Mcp1 (Monocyte chemoattractant protein 1) proteolytisch abbaut und Immunantworten dadurch moduliert werden (Miyamoto et al. 2006, Okuda et al. 2007, Jo et al. 2014). Außerdem greift es die interzelluläre Matrix proteolytisch an und durch den Abbau interzellulärer Adhäsionsmoleküle wird scheinbar auch die Penetration von Epithelzellen durch T.d. begünstigt (Chi et al. 2003). Dentilisin spaltet möglicherweise auch andere Oberflächenproteine wie Msp und interagiert mit den Fimbrien von P.g. und ist an der Co-Aggregation dieser Bakterien beteiligt (Sano et al. 2014). Wie auch der RgpA-Kgp Komplex von P.g., so bindet auch der Dentilisin-PrcA-Komplex von T.d. an Fibrinogen und bewirkt dessen Abbau, wodurch Effekte wie Blutungsneigung und Verzögerungen in der Reparatur der Schadstellen erklärt werden können (Bamford et al. 2007).

Leucin-rich-repeat Proteine

LrrA ist ein Protein der Klasse der LLR Proteine (leucin-rich repeat proteins), welches die Bindung von T.d. an T.f. (nicht jedoch an P.g.) und an Epithelzellen vermittelt. So wird die Expression weiterer putativer LRR-Proteine bei T.d. anhand von Sequenzanalysen vermutet. Bei P.g. spielen LRR Proteine eine Rolle im Prozess der Zellpenetration epithelialer Zellen und der Ausbildung des Biofilms. Auch bei T.f. spielt das LRR-Protein BspA bei der Zellinvasion eine Rolle und als Virulenzfaktor in einem murinen Modell des Knochenabbaus (Sharma et al. 1998, 2005, Capestany et al. 2006, Inagaki et al. 2006, Dashper et al. 2009). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch bei T.d. LRR-Proteine eine Rolle als Virulenzfaktoren spielen mögen.

Cystalysin

Die metabolischen Endprodukte von T.d., u.a. Acetat, Lactat, Pyruvat, Hydrogensulfid (H₂S) und Ammoniak können sowohl die biologische Zusammensetzung des Biofilms beeinflussen als auch das Wirtsgewebe angreifen und Immunantworten modulieren (Hespell und Canele Parola 1971, Carlsson 1997, Kuramitsu et al. 2007). Die flüchtige aber extrem toxische Schwefelverbindung Hydrogensulfid z.B. entsteht bei der Cysteinfermentation von T.d. in einem metabolischen Prozess, der auch das neu entdeckte Protein Cystalysin involviert (Chu et al. 2002, 2008). Cystalysin-vermittelte H₂S-Produktion führt zur Zersetzung der Membranen von Erythrozyten, was die hämolytische Aktivität von T.d. erklärt, und hat sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte, was zu einer Deregulation der Wirtsimmunantwort beitragen mag (Chu et al. 1995, Chen et al. 2010).

Lipooligosaccharide

Treponemen gehören gemäß aktuellen Klassifizierungen weder zu den gram-positiven noch zu den gram negativen Bakterien. Daher besitzen sie auch nicht die für gram-negative Bakterien typischen, immunstimulierenden Lipopolysaccharide (LPS) in der Außenhülle. Stattdessen besitzen Treponemen Lipooligosaccharide (LOS), die funktionelle Ähnlichkeiten zu LPS haben. LOS besitzen ein proinflammatorisches Potential und binden an Proteine der extrazellulären Matrix, an Mucosazellen und an andere orale Bakterien, was die proentzündliche Funktion weiter verstärken könnte (Grenier et al. 2013). TLR (toll-like receptors), Oberflächenrezeptoren, die der Erkennung von konservierten Bakterienstrukturen dienen, leiten entsprechende Signale weiter, die zur Expression proinflammatorischer Gene führen. Kommt es bei diesem Prozess zu einer Deregulation, kann die für die Parodontitis typische Gewebeschädigung auftreten (s.o.). Auch von P.g. und T.f. ist es bekannt, dass sie in TLR-vermittelte Signaltransduktionswege eingreifen. Bei T.d. tritt TLR Stimulierung hauptsächlich durch LOS auf, welche in einer Vielzahl von Zellen proinflammatorische Botenstoffe induzieren (Tanabe et al. 2008).

Oberflächen-Vesikel

Die runden Vesikel die an der Oberfläche von T.d. entstehen, enthalten Adhäsine, Toxine und proteolytische Proteine und werden daher als starke Virulenzfaktoren eingeordnet. Sie

sind an Funktionen wie bakterieller Aggregation und Zellinvasion beteiligt, sie sind zytotoxisch und können die Wirts-Immunantwort modulieren (Wensink und Withold 1981, Kuehn und Ketsy 2005). Als Transportvesikel können sie wenig stabile Signalmoleküle an weiter entfernte Stellen transportieren, dabei vor Abbau schützen und können dabei besser in Gewebe eindringen als das Bakterium selbst (Li Z et al. 1996, Mashburn und Whiteley 2005, Kuehn und Kesty 2005). Die Vesikel werden in der Monokultur aber auch bei Ko-Kultivierung mit *Porphyromonas gingivalis* beobachtet, eine in-vivo Relevanz ist also wahrscheinlich (Dashper et al. 2011). Sowohl LOS als auch Msp finden sich in den Vesikeln und beide können in Makrophagen ein Immuntoleranzverhalten auslösen, was dem Bakterium einen Überlebensvorteil sichert (Nussbaum et al. 2009).

Motilität und Chemotaxis

Auch die Beweglichkeit und die Chemotaxis von T.d. können zur Virulenz des Bakteriums beitragen. Ein spezieller Flagellen-Aufbau erlaubt *Treponema*, sich auch unter sehr viscosen Bedingungen zu bewegen, was einen Selektionsvorteil darstellt (Fenno und McBride 1998). Durch Chemotaxis kann das Bakterium auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren. Umweltreize werden dabei durch Chemotaxis-Proteine durch die Zellhülle geleitet und wirken über weitere Proteine auf den Flagellenmotor und die Richtung der Flagellenrotation (Sim et al. 2005). Anziehend auf T.d. wirken dabei Glukose, Serum und Albumin, Stoffe, die auch in Zusammenhang mit Gewebezerstörung stehen, was darauf hinweist, dass sich T.d. zu Orten hinbewegt, an denen bereits Gewebeschädigung aufgetreten ist (Umemoto et al. 2001, Ruby et al. 2008). Die Möglichkeit der Chemotaxis hängt natürlich mit einem intakten Bewegungsapparat zusammen. Interessant in Bezug auf die Virulenz ist dabei die Beobachtung, dass sowohl Mutanten ohne Flagellen als auch Mutanten mit Störungen in Chemotaxis-Signaltransduktionswegen Störungen bzw. Versagen der Fähigkeit der extrazellulären Penetration von Geweben zeigen (Li H et al. 1996, Lux et al. 2002, Kataoka et al. 1997, Li et al. 1999). Internalisierung von Bakterien durch Epithelzellen bieten den Mikroorganismen die Möglichkeit, vom Nahrungsvorrat zu profitieren und gleichzeitig teilweise der Immunantwort und auch dem Angriff durch z.B. pharmazeutische Antibiotika zu entgehen, weshalb dieser Aufenthaltsort ein Reservoir für die Latenz der Organismen darstellt (Colombo et al. 2007, Johnson et al. 2008).

Transposasen

Neben Proteinen, die direkt oder indirekt als Virulenzfaktoren wirken, kann auch die genetische Variabilität, mit deren Hilfe das Bakterium sich an die Umwelt anpassen kann, als potentiell virulent eingestuft werden. Bei der Evolution der Spirochäten spielte horizontaler Gentransfer mit anderen Organismen eine große Rolle was die Bereitschaft des Organismus zur genetischen Adaption zeigt (Dashper et al. 2011). T.d. besitzt beispielsweise 35 Gensequenzen mit Homologien zu Transposasen, Enzymen, welche in der Lage sind, Genabschnitte aus dem Genom herauszuspalten und – an anderer Stelle – wieder einzufügen. 25 dieser Gene sind heraufreguliert, wenn das Bakterium im Biofilm eingebunden ist, was eine Vielzahl chromosomaler Rearrangements nahelegt. Auch horizontaler Gentransfer durch Bakteriophagen (ϕ td1) findet statt, was zu einem Import von virulenzassoziierten Genen führen mag. Beides stellen Mechanismen der genetischen Diversifizierung dar, welche der Vereinfachung der Umweltanpassung sowie der Genregulation dienlich sein können (Mitchell 2010).

Toxin/Antitoxinsysteme

Bakterielle Toxin-Antitoxinsysteme, von denen in T.d. 33 anhand von Sequenzanalysen postuliert wurden, können an bakterieller Resistenz sowie der Persistenz von Biofilmen beteiligt sein und damit als Virulenzfaktoren verstanden werden (Kim et al. 2009, Makarova et al. 2009, Jayaraman 2008).

5.5 Polymikrobielle Synergie, Biofilmbildung und Therapieansätze

Die Virulenzfaktoren der Vertreter des ‚Roten Komplex‘ wirken nicht nur alleine bzw. im Kontext des Bakteriums, sondern auch synergistisch. Im oralen Biofilm kommt es unter den Bakterien durch Zell-Zell Kontakt und lösliche Botenstoffe zu zahlreichen Interaktionen, z.B. zum sogenannten ‚cross-feeding‘, einem Prozess, in dem ein Bakterium die Abbauprodukte des anderen verstoffwechselt, gemeinsam werden Aktivitäten wie Genexpression reguliert, Nährstoffe akquiriert und DNA ausgetauscht. Andererseits stehen die Mikroben aber auch im Wettstreit um Nährstoffe. Von polymikrobieller Synergie spricht man dann, wenn Bakterien in der Anwesenheit bestimmter anderer Mikroben besser wachsen und erfolgreicher Krankheitssymptome auslösen können (Kuboniwa und Lamont 2010, Hajishengallis und Lamont 2012).

Auf der Zahnoberfläche binden Bakterien in charakteristischer Reihenfolge, was zu einer aus verschiedenen Schichten bestehenden, komplexen Mikrobiota führt. Tiefer liegende Schichten bieten dabei ideale Lebensbedingungen für Anaerobier, die hier expandieren. Eine Spezies, die sich in diesem Biofilm ansiedeln möchte, muss nun an andere Komponenten binden und unter den herrschenden Lebensbedingungen (Sauerstoffgehalt, Nährstoffe) gedeihen können. Die Anheftung kann auf Wirtsoberflächen, aber auch durch Auto- und Koaggregation vonstattengehen. Die Anordnung im Biofilm ermöglicht den metabolischen Austausch und die Ausführung synergistischer Strategien und ist daher von Vorteil für die Bakterien (Hansen et al. 2007).

Synergistische Effekte bei Mischinfektionen mit Organismen des roten Komplexes wurden bereits beschrieben: P.g. und T.d. wachsen in einer Mischkultur deutlich besser als in Monokultur, und durch die Anwesenheit des jeweils anderen Bakteriums werden bekannte Virulenzfaktoren hochreguliert (Tan et al. 2014). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass während P.g. alleine keine Parodontitis-assoziierten Pathogenese-Phänotypen hervorrufen kann, sie es doch vermag, eine vorhandene Mikrobiota in die Dysbiose zu führen (Kesavalu et al. 2007, Suzuki et al. 2013). In vitro zeigen die LPS von P.g., T.d. und T.f. synergistische Effekte bei der Stimulation von Immunantworten (Bodet et al. 2010) Ein interessantes weiteres Beispiel für die mikrobielle Synergie ist die gut untersuchte Bindung von *Streptococcus gordonii* und P.g. Eine Interaktion die P.g. von einer nicht pathogenen in eine pathogene Form transferieren kann (Kuboniwa und Lamont 2010).

P.g. bindet an frühe Besiedler des Biofilms und kann als eine Art Brücke fungieren, da es auch an späte Besiedler bindet (Kolenbrander et al. 2002, Haffajee et al. 2008) Es ist

weiterhin bekannt, dass Vertreter des ‚Roten Komplexes‘ auch mit anderen Spezies Biofilme ausbilden, z.B. T.d. mit *Fusobacterium nucleatum* oder die oben beschriebene Interaktion von P.g. mit *Streptococcus gordonii* (Kuboniwa und Lamont 2010, Honma et al. 2015). Weitere Interaktionen sind bekannt. Die Untersuchung von Kooperation im Biofilm ist teilweise aber auch noch deskriptiver Natur, und es fehlt die Identifikation von zugrundeliegenden Mechanismen und Virulenzfaktoren (Suzuki et al. 2013).

Mehr noch als sich auf die biochemischen Eigenschaften einzelner im pathogenen Bakterienverbund vorkommender Keime zu konzentrieren, sieht man heute im Pathogeneseprozess das polymikrobiell synergistische Zusammenspiel der Mikroorganismen im Verband als essentiell an. Immunsuppression, Beeinflussung gegenseitiger Genexpression sowie der gemeinschaftlich koordinierte Abbau von Makromolekülen und DNA- Austausch spielen hierbei eine Rolle. Dabei ist weniger das Vorkommen spezifischer Pathogene entscheidend als vielmehr die Besetzung von Schlüsselfunktionen des Pathogeneseprozesses durch hierfür geeignete Mikroorganismen (Hajishengallis und Lamont 2012).

Das Modell des ‚roten Komplexes‘, in dem dessen drei Vertreter als Hauptverursacher der Parodontitis dargestellt werden, erwuchs aus der Tatsache, dass ihre Bedeutung aufgrund ihres besseren Wachstums in der Zellkultur überschätzt wurde. Heute nutzt man metagenomische Ansätze um die Beteiligung verschiedener Spezies am Plaque genauer zu definieren, und es zeigte sich, dass auch Vertreter der Gattungen *Anaeroglobus*, *Bulleidia*, *Desulfobulbus*, *Filifactor*, *Mogibacterium*, *Phocaeicola*, *Schwartzia*, TM7, *Atopobium*, *Eubacterium* und *Peptostreptococcus* zu den ‚späten Besiedlern‘ zu zählen sind. Die Untersuchung der Einflüsse dieser Bakterien auf den Pathogeneseverlauf steht noch in ihren Anfängen. Hajishengallis formulierte daher 2012 das allgemeiner gehaltene Modell der ‚polymikrobiellen Synergie und Dysbiose‘. Demzufolge die Entwicklung problematischer Verlaufsformen der Parodontitis aus der Dysbiose der parodontalen Mikrobiota infolge der Zerstörung der Wirt-Mikroben Homöostase resultiert.

Die pathologischen Mechanismen, die der Parodontitis zugrunde liegen, werden im Verlauf der Forschungen besser verstanden, und es eröffnen sich daraus neue therapeutische und auch präventive Ansatzmöglichkeiten. Probiotika und antiinflammatorische Medikamente werden beispielsweise verwendet, um die Mikrobiota in ihrer Zusammensetzung zu beeinflussen (Takashiba et al. 1999, Anusha et al. 2015). Auch photodynamische Therapie oder peptidbasierte Therapeutika kommen zum Einsatz (Moreira et al. 2015, Guevara et al. 2013). Polysaccharide können möglicherweise Biofilme zur Auflösung bringen, und auch die Hemmung bestimmter Bestandteile des Komplementsystems (C3) hat sich im

Tiermodell bewährt (Renudueles et al. 2013, Maekawa et al. 2014).

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamson MM, Kikstrom J, Potempa S, Renvert A. 1997. Modification of cystatin C activity by bacterial proteinases and neutrophil elastase in periodontitis. *Mol Pathol*, 50:291-297.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4:499–511.
- Amano A. 2007. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci*, 12:3965-74.
- Amano A. 2010. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol 2000*, 52(1):12-37.
- Amano A. Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. 2010. *Periodontol 2000*, 54(1):9-14
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*, 39(2):136-42.
- Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. 2000. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. *J Dent Res*, 79(9):1664-8.
- Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gómez M, Torres O, Flórez L, González CI, Flórez O. 2013. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J*, 46(1):71-8.
- Amin M, Grove DA, Kapus A, Glogauer M, Ellen RP. 2007. An actin-stabilizing peptide conjugate deduced from the major outer sheath protein of the bacterium *Treponema denticola*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64(9):662-74.
- Anand A, Luthra A, Edmond ME, Ledoyt M, Caimano MJ, Radolf JD. 2013. The major outer sheath protein (Msp) of *Treponema denticola* has a bipartite domain architecture and exists

as periplasmic and outer membrane-spanning conformers. *J Bacteriol*, 195(9):2060-71.

Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. 2004. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4689-98.

Anusha RL, Umar D, Basheer B, Baroudi K. 2015. The magic of magic bugs in oral cavity: Probiotics. *J Adv Pharm Technol Res*. 6(2):43-7

Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. 2000 Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 68(8):4611-5.

Aruni AW, Robles A, Fletcher HM. 2013. VimA mediates multiple functions that control virulence in *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*, 28(3):167-80.

Asai Y1, Ohshima Y, Gen K, Ogawa T. 2001. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*, 69(12):7387-95.

Batista da Silva AP, Lee W, Bajenova E, McCulloch CA, Ellen RP. 2004. The major outer sheath protein of *Treponema denticola* inhibits the binding step of collagen phagocytosis in fibroblasts. *Cell Microbiol*, 6(5):485-98.

Bamford CV, Fenno JC, Jenkinson HF, Dymock D. 2007. The chymotrypsin-like protease complex of *Treponema denticola* ATCC 35405 mediates fibrinogen adherence and degradation. *Infect Immun*, 75(9):4364-72.

Banbula A, Yen J, Oleksy A, Mak P, Bugno M, Travis J, Potempa J. 2001. *Porphyromonas gingivalis* DPP-7 represents a novel type of dipeptidylpeptidase. *J Biol Chem*, 276(9):6299-305.

Bartold PM, Van Dyke TE. 2013. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000*, 62(1):203-17.

Beall CJ, Campbell AG, Dayeh DM, Griffen AL, Podar M, Leys EJ. 2014. Single cell genomics of uncultured, health-associated *Tannerella* BU063 (Oral Taxon 286) and

comparison to the closely related pathogen *Tannerella forsythia*. PLoS One, 9(2):e89398.

Bélanger M, Rodrigues PH, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. 2006. Autophagy: a highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. Autophagy, 2(3):165-70.

Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sara, M. & 22 other authors. 1997. Functions of S-layers. FEMS Microbiol Rev, 20:99–149.

Bhattacharya R, Xu F, Dong G, Li S, Tian C, Ponugoti B, Graves DT. 2014. Effect of bacteria on the wound healing behavior of oral epithelial cells. PLoS One, 9(2):e89475.

Bian J, Liu X, Cheng YQ, Li C. 2013. Inactivation of cyclic Di-GMP binding protein TDE0214 affects the motility, biofilm formation, and virulence of *Treponema denticola*. J Bacteriol. 195(17):3897-905.

Bielecka E, Scavenius C, Kantyka T, Jusko M, Mizgalska D, Szmigielski B, Potempa B, Enghild JJ, Prossnitz ER, Blom AM, Potempa J. 2014. Peptidyl arginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* abolishes anaphylatoxin C5a activity. J Biol Chem, 289(47):32481-7.

Bird PS, Shakibaie F, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ. 2001. Immune response to *Bacteroides forsythus* in a murine model. Oral Microbiol Immunol, 16(5):311-5.

Bodet C, Grenier D. 2010. Synergistic effects of lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria on pro-inflammatory cytokine production in an ex vivo whole blood model. Mol Oral Microbiol, 25(2):102-11.

Brisette CA, Pham TT, Coats SR, Darveau RP, Lukehart SA. 2008. *Treponema denticola* does not induce production of common innate immune mediators from primary gingival epithelial cells. Oral Microbiol Immunol, 23(6):474-81.

Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Crielaard W. 2010. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. BMC Microbiol, 10:5.

Bryzek D, Ksiazek M, Bielecka E, Karim AY, Potempa B, Staniec D, Koziel J, Potempa J. A pathogenic trace of *Tannerella forsythia* - shedding of soluble fully active tumor necrosis factor α from the macrophage surface by karilysin. 2014. *Mol Oral Microbiol*, 29(6):294-306.

Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. 2006. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J Immunol*, 177(12):8296-300.

Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J. 1998. Inactivation of tumor necrosis factor α by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. *J Biol Chem*. 273:6611-6614.

Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, Tomás I. 2015. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol*, 24(6):119.

Capestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuth DR, Lamont RJ. 2008. Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 190(4):1436-46.

Capestany CA, Kuboniwa M, Jung IY, Park Y, Tribble GD, Lamont RJ 2006. Role of the *Porphyromonas gingivalis* InlJ protein in homotypic and heterotypic biofilm development. *Infect Immun*, 74(5):3002-5.

Capone R, Wang HT, Ning Y, Sweier DG, Lopatin DE, Fenno JC. 2008. Human serum antibodies recognize *Treponema denticola* Msp and PrtP protease complex proteins. *Oral Microbiol Immunol*, 23(2):165-9.

Carlsson J. 1997. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res*, 11(1):75-80.

Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ. 2001. *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun*, 69(5):3048-56.

Chen W, Kajiya M, Giro G, Ouhara K, Mackler HE, Mawardi H, Boisvert H, Duncan MJ, Sato K, Kawai T. 2010. Bacteria-derived hydrogen sulfide promotes IL-8 production from epithelial

cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1):645-50.

Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. 2003. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*, 154(9):637-43.

Chu L, Burgum A, Kolodrubetz D, Holt SC. 1995. The 46-kilodalton-hemolysin gene from *Treponema denticola* encodes a novel hemolysin homologous to aminotransferases. *Infect Immun*. 63(11):4448-55.

Chu L, Dong Z, Xu X, Cochran DL, Ebersole JL. 2002. Role of glutathione metabolism of *Treponema denticola* in bacterial growth and virulence expression. *Infect Immun*, 70(3):1113-20.

Chu L, Lai Y, Xu X, Eddy S, Yang S, Song L, Kolodrubetz D. 2008. A 52-kDa leucyl aminopeptidase from *treponema denticola* is a cysteinylglycinase that mediates the second step of glutathione metabolism. *J Biol Chem*, 283(28):19351-8.

Clais S, Boulet G, Kerstens M, Horemans T, Teughels W, Quirynen M, Lanckacker E, De Meester I, Lambeir AM, Delpitte P, Maes L, Cos P. 2014. Importance of biofilm formation and dipeptidyl peptidase IV for the pathogenicity of clinical *Porphyromonas gingivalis* isolates. *Pathog Dis*, 70(3):408-13.

Coats SR, To TT, Jain S, Braham PH, Darveau RP. 2009. *Porphyromonas gingivalis* resistance to polymyxin B is determined by the lipid A 4'-phosphatase, PGN_0524. *Int J Oral Sci*, 1(3):126-35.

Colombo AV, da Silva CM, Haffajee A, Colombo AP. 2007. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J Periodontal Res*, 42(3):236-43.

Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Paster BJ. 2009. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis and periodontal health using the human oral microbe identification microarray (HOMIM). *J Periodontol*, 80(9):1421-1432.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000.14:12-32.

Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. 2011. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res*, 90(6):691-703.

Dashper SG, Ang CS, Veith PD, Mitchell HL, Lo AW, Seers CA, Walsh KA, Slakeski N, Chen D, Lissel JP, Butler CA, O'Brien-Simpson NM, Barr IG, Reynolds EC. 2009. Response of *Porphyromonas gingivalis* to heme limitation in continuous culture. *J Bacteriol*, 191(3):1044-55.

Davey M, Liu X, Ukai T, Jain V, Gudino C, Gibson FC 3rd, Golenbock D, Visintin A, Genco CA. 2008. Bacterial fimbriae stimulate proinflammatory activation in the endothelium through distinct TLRs. *J Immunol*, 180(4):2187-95.

Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D. 2004. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog*, 36(6):319-25.

Edwards AM¹, Jenkinson HF, Woodward MJ, Dymock D. 2005. Binding properties and adhesion-mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infect Immun*, 73(5):2891-8.

Eskan MA, Hajishengallis G, Kinane DF. 2007. Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun*, 75(2):892-8.

Evans RT, Klausen B, Sojar HT, Bedt GS, Sfintescu, Ramamurthy NS, Golub M, Genco RJ. 1992. Immunization with *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. *Infect Immun*, 60:2926-2935.

Fenno JC, McBride BC. 1998. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe*, 4(1):1-17.

Fenno JC, Tamura M, Hannam PM, Wong GW, Chan RA, McBride BC. 2000. Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. *Infect Immun*, 68(4):1884-92.

Fenno JC, Wong GW, Hannam PM, Müller KH, Leung WK, McBride BC. 1997. Conservation of msp, the gene encoding the major outer membrane protein of oral *Treponema* spp. *J Bacteriol*, 79(4):1082-9.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. 2007. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*. 45(12):3859-69

Fitzpatrick RE, Wijeyewickrema LC, Pike RN. 2009. The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiol*, 4(4):471-87.

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000. 20:136-67.

Fullmer SC, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. 2009. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res*, 88(6):524.

Furuta N, Takeuchi H, Amano A. 2009. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect Immun*, 77(11):4761-70.

Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M, Hrsg. 2005. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*, Zweite Aufl. Stuttgart, New York; Thieme Verlag, S.263-264.

Glockmann, E., Panzner, K.-D., Huhn, P., Sigusch, B. W., Glockmann, K. 2007. Ursachen des Zahnverlustes in Deutschland. – Dokumentation einer bundesweiten Erhebung IDZ-Information Nr. 2/11.

Golub LM, Payne JB, Reinhardt RA, Nieman G. 2006. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical "two-hit" model. *J Dent Res*, (2):102-5.

Goulas T, Mizgalska D, Garcia-Ferrer I, Kantyka T, Guevara T, Szmigielski B, Sroka A, Millán C, Usón I, Veillard F, Potempa B, Mydel P, Solà M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. 2015. Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor,

Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase. Sci Rep, 5:11969.

Goulbourne PA1, Ellen RP. 1991. Evidence that Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbriae function in adhesion to Actinomyces viscosus. J Bacteriol, 173(17):5266-74.

Grenier D. 1995. Characterization of the trypsin-like activity of Bacteroides forsythus. Microbiology, 141:921–926.

Grenier D. 2013. Binding properties of Treponema denticola lipooligosaccharide. J Oral Microbiol, 16:5.

Grenier D, Mayrand D. 1987. Functional characterization of extracellular vesicles produced by Bacteroides gingivalis. Infect Immun, 55(1):111-7.

Guevara T, Ksiazek M, Skottrup PD, Cerdà-Costa N, Trillo-Muyo S, de Diego I, Riise E, Potempa J, Gomis-Rüth FX. 2013. Structure of the catalytic domain of the Tannerella forsythia matrix metallopeptidase karilysin in complex with a tetrapeptidic inhibitor. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 69(Pt 5):472-6.

Gumbiner BM. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell, 84(3):345-57.

Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. 2008. Microbial complexes in supragingival plaque. Oral Microbiol Immunol. 23(3):196-205.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lope, NJ, Socransky SS. 2004. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. J Clin Periodontol, 11:996–1002.

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. 1998. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. J Clin Periodontol, 25(5):346-53.

Hajishengallis G 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol, ;35(1):3-11.

Hajishengallis G, Harokopakis E. 2007. Porphyromonas gingivalis interactions with complement receptor 3 (CR3): innate immunity or immune evasion? Front Biosci,12:4547-57.

Hajishengallis G, Lambris JD. 2012. Complement and dysbiosis in periodontal disease. Immunobiology, 217(11):1111-6.

Hajishengallis G, Lamont RJ 2012. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol Oral Microbiol, 27(6):409-19.

Hajishengallis G, Chavakis T, Hajishengallis E, Lambris JD. 2014. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. J Leukoc Biol, pii: jlb.3VMR1014-468R.

Hajishengallis G, Wang M, Bagby GJ, Nelson S. 2008. Importance of TLR2 in early innate immune response to acute pulmonary infection with Porphyromonas gingivalis in mice. J Immunol, 181(6):4141-9.

Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Russell MW, Genco RJ. 2002. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 9:403–401.

Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E, Nishiyama S, Ratti P, Schifferle RE, Lyle EA, Triantafilou M, Triantafilou K, Yoshimura F. 2006. Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus. Cell Microbiol, 8(10):1557-70.

Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. 2011. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. Cell Host Microbe, 10(5):497-506.

Hamada N, Watanabe K, Arai M, Hiramane H, Umemoto T. 2002. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from Porphyromonas gingivalis. Oral Microbiol Immunol,

17(3):197-200.

Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H. 2000. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Genco RJ Infect Immun*, 68(6):3140-6.

Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JA, Molin S. 2007. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*. 445(7127):533-6.

Haraguchi A, Miura M, Fujise O, Hamachi T, Nishimura F. 2014. *Porphyromonas gingivalis* gingipain is involved in the detachment and aggregation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. *Mol Oral Microbiol*, 29(3):131-43.

Harokopakis E, Albzreh MH, Martin MH, Hajishengallis G. 2006. TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Immunol*, 176(12):7645-56.

Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata K. 2004. Biological Activities of *Bacteroides forsythus* Lipoproteins and Their Possible Pathological Roles in Periodontal Disease. *Infect Immun*, 72(3):1318–1325.

Hashimoto M, Ogawa S, Asai Y, Takai Y, Ogawa T. 2003. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol Lett*, 226(2):267-71.

Hasturk H, Kantarci A, Van Dyke TE. 2012. Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. *Front Immunol*, 16;3:118.

Haunfelder D. 1990. *Praxis der Zahnheilkunde Bd.4 Parodontologie* 2. Aufl. Urban u. Schwarzenberg. München-Wien-Baltimore.

Hespell RB, Canale-Parola E. 1971. Amino acid and glucose fermentation by *Treponema denticola*. *Arch Mikrobiol*, 78(3):234-51.

Hiramine H, Watanabe K, Hamada N, Umemoto T. 2003. *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa

fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. FEMS Microbiol Lett., 229(1):49-55.

Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. 2014. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. Infect Immun, 82(10):4190-203.

Holt, SC and Ebersole JL. 2005. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000, 38:72-122.

Honma, K., Kuramitsu, H. K., Genco, R. J. & Sharma, A. 2001. Development of a gene inactivation system for Bacteroides forsythus: construction and characterization of a BspA mutant. Infect Immun, 69:4686–4690.

Honma K, Ruscitto A, Frey AM, Stafford GP, Sharma A. 2015. Sialic acid transporter NanT participates in Tannerella forsythia biofilm formation and survival on epithelial cells. Microb Pathog. pii: S0882-4010(15)00143-6.

Hughes CV, Malki G, Loo CY, Tanner AC, Ganeshkumar N. 2003. Cloning and expression of alpha-D-glucosidase and N-acetyl-beta-glucosaminidase from the periodontal pathogen, Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus). Oral Microbiol Immunol, 18(5):309-12.

Hussain M, Stover CM, Dupont A. 2015. P. gingivalis in Periodontal Disease and Atherosclerosis - Scenes of Action for Antimicrobial Peptides and Complement. Front Immunol, 6:45.

Imamura T, Travis J, Potempa J 2003. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. Curr Protein Pept Sci, 4(6):443-50.

Inagaki S, Onishi S, Kuramitsu HK, Sharma A. 2006. Porphyromonas gingivalis vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "Tannerella forsythia". Infect Immunol, 74(9):5023-8.

Irshad M, van der Reijden WA, Crielaard W, Laine ML. 2012. In vitro invasion and survival

of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60(6):469-76.

Ishikura H, Arakawa S, Nakajima T, Tsuchida N, Ishikawa I. 2003. Cloning of the *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) *siaHI* gene and purification of the sialidase enzyme. *J Med Microbiol*, 52(Pt 12):1101-7.

Jagels MA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. 1996. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 64:1984-1991.

Jayaraman R. 2008. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J. Biosci*, 33(5):795-805.

Jo AR, Baek KJ, Shin JE, Choi Y. 2014. Mechanisms of IL-8 suppression by *Treponema denticola* in gingival epithelial cells. *Immunol Cell Biol*, 92(2):139-47.

Jobin MC, Virdee I, McCulloch CA, Ellen RP. 2007. Activation of MAPK in fibroblasts by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(1):213-8.

Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. 2008. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 79(12):2305-12.

Jun HK, Lee SH, Lee HR, Choi BK. 2012. Integrin $\alpha 5\beta 1$ activates the NLRP3 inflammasome by direct interaction with a bacterial surface protein. *Immunity*, 36(5):755-68.

Jusko M, Potempa J, Karim AY, Ksiazek M, Riesbeck K, Garred P, Eick S, Blom AM. 2012. A metalloproteinase karilysin present in the majority of *Tannerella forsythia* isolates inhibits all pathways of the complement system. *J Immunol*, 188(5):2338-49.

Kadowaki T1, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, Ratnayake DB, Yamamoto K. 2000. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem*, 128(2):153-9.

Kamaguchi A, Nakayama K, Ichiyama S, Nakamura R, Watanabe T, Ohta M, Baba H, Ohshima T. 2003. Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms. *Curr Microbiol*, 47(6):485-91.

Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen KA, Potempa J. 2010. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem*, 391(1):105-17.

Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. 2015. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem*. 290(33):20147-58.

Kataoka M, Li H, Arakawa S, Kuramitsu H. 1997. Characterization of a methyl-accepting chemotaxis protein gene, *dmcA*, from the oral spirochete *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 65(10):4011-6.

Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, Tsuda K, Omori H, Ooshima T, Yoshimori T, Amano A. 2007. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell Microbiol*, 9(3):753-65.

Kerusuo E. 1988. Ultrastructure of the cell envelope of *Bacteroides forsythus* strain ATCC 43037T. *Oral Microbiol Immunol*, 3(3):134-7.

Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, Ebersole JL. 2007. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun*, 75(4):1704-12.

Khocht A, Albandar JM. 2014. Aggressive forms of periodontitis secondary to systemic disorders. *Periodontol 2000*, 65(1):134-48.

Kinane JA, Benakanakere MR, Zhao J, Hosur KB, Kinane DF. 2012. *Porphyromonas gingivalis* influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cell Microbiol*, 14(7):1085-96.

Kim M, Jun HK, Choi BK, Cha JH, Yoo YJ. 2012. Td92, an outer membrane protein of *Treponema denticola*, induces osteoclastogenesis via prostaglandin E(2)-mediated RANKL/osteoprotegerin regulation. *J Periodontal Res*, 45(6):772-9.

Kim TS, Kang NW, Lee SB, Eickholz P, Pretzl B, Kim CK. 2009. Differences in subgingival microflora of Korean and German periodontal patients. *Arch Oral Biol*, 54(3):223-9.

Kolenbrander P, Andersen RA, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ. 2002. Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66(3): 486–505.

Koziel J, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, Potempa J. 2010. Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J Innate Immun*, 2(3):288-93.

Krauss JL, Potempa J, Lambris JD, Hajishengallis G. 2010. Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol 2000*, 52(1):141-62.

Ksiazek M, Mizgalska D, Enghild JJ, Scavenius C, Thogersen IB, Potempa J. 2015. Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop. *J Biol Chem*, 290(1):658-70.

Kuboniwa M, Lamont RJ. 2010. Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000*. 52(1):38-52.

Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. 2010. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 9(3):311-23.

Kuboniwa M, Amano A, Hashino E, Yamamoto Y, Inaba H, Hamada N, Nakayama K, Tribble GD, Lamont RJ, Shizukuishi S. 2009. Distinct roles of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*, 9:105.

Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. 2007. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(4):653-70.

Kurniyati K, Zhang W, Zhang K, Li C. 2013. A surface-exposed neuraminidase affects complement resistance and virulence of the oral spirochaete *Treponema denticola*. *Mol Microbiol*, 89(5):842-56.

Kuboniwa M, Lamont RJ. 2010. Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000*, 52(1): 38–52.

Kuehn MJ, Kesty NC. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*, 19(22):2645-55.

Laheij AM, de Soet JJ, Veerman EC, Bolscher JG, van Loveren C. 2013. The influence of oral bacteria on epithelial cell migration in vitro. *Mediators Inflamm*. 154532.

Laine ML, van Winkelhoff AJ. 1998. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*, 13(5):322-5.

Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(4):1244-63.

Lamont RJ, Jenkinson HF. 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 15(6):341-9.

Lantz MS, Allen RD, Duck LW, Switalski LM, Hook M. 1991. *Porphyromonas gingivalis* surface components bind and degrade connective tissue proteins. *Periodont Res*, 26:283-285.

Lee SY, Fenno JC. 2004. Expression of *Treponema denticola* oligopeptidase B in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 48(5):379-82.

Lee SH, Kim KK, Choi BK. 2005. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 and proinflammatory cytokines by the major surface proteins of *Treponema maltophilum* and *Treponema lecithinolyticum*, the phylogenetic group IV oral spirochetes associated with periodontitis and endodontic infections. *Infect Immun*, 73(1):268-76.

Lee SW, Sabet M, Um HS, Yang J, Kim HC, Zhu W. 2006. Identification and characterization of the genes encoding a unique surface (S-) layer of *Tannerella forsythia*. *Gene*, 371(1):102-11.

Lépine G, Progulske-Fox A. 1996. Duplication and differential expression of hemagglutinin genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 11(2):65-78.

Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, Li F, Tzekou A, Lambris JD, Hajishengallis G. 2011. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol*, 186(2):869-77.

Li H, Kuramitsu HK. 1996. Development of a gene transfer system in *Treponema denticola* by electroporation. *Oral Microbiol Immunol*, 11(3):161-5.

Li H, Arakawa S, Deng QD, Kuramitsu H. 1996. Characterization of a novel methyl-accepting chemotaxis gene, *dmcB*, from the oral spirochete *Treponemadenticola*. *Infect Immun*, 67(2):694-9.

Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ. 1996. A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *J Bacteriol*, 178(9):2479-88.

Lin FY, Hsiao FP, Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Tsai CS, Yang SF, Chang NC, Hung SL, Lin YW. 2014. *Porphyromonas gingivalis* GroEL induces osteoclastogenesis of periodontal ligament cells and enhances alveolar bone resorption in rats. *PLoS One*. 9(7):e102450.

Loesche, WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, Stoll J, Socransky SS, Hujoel P, Lopatin DE. 1990. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-*dl*-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol*, 28:1551–1559.

Lux R, Sim JH, Tsai JP, Shi W. 2002. Construction and characterization of a *cheA* mutant of *Treponema denticola*. *J Bacteriol*, 184(11):3130-4.

Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M, Kataoka K, Nishida N, Tanaka M, Shizukuishi S. 2004.

Characterization of binding of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun*, 72(9):5475-7.

Maekawa T, Hajishengallis G. 2014. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res*. 49(6):785-91.

Magalhães MA, Sun CX, Glogauer M, Ellen RP. 2008. The major outer sheath protein of *Treponema denticola* selectively inhibits Rac1 activation in murine neutrophils. *Cell Microbiol*, 10(2):344-54.

Maiden MF, Cohee P, Tanner AC. 2003. Proposal to conserve the adjectival form of the specific epithet in the reclassification of *Bacteroides forsythus* Tanner et al. 1986 to the genus *Tannerella* Sakamoto et al. 2002 as *Tannerella forsythia* corrig., gen. nov., comb. nov. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 6):2111-2.

Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2009. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct*, 4:19.

Malek R, Fisher JG, Caleca A, Stinson M, van Oss CJ, Lee JY, Cho MI, Genco RJ, Evans RT, Dyer DW. 1994. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis* fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *J Bacteriol*, 176(4):1052-9.

Markiewski MM, Lambris JD. 2007. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol*, 171(3):715-27.

Mashburn LM, Whiteley M. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437(7057):422-5.

Mayrand D, Holt SC. 1988. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev*, 52(1):134-52.

McDowell JV, Frederick J, Stamm L, Marconi RT. 2007. Identification of the gene encoding the FhbB protein of *Treponema denticola*, a highly unique factor H-like protein 1 binding

protein. *Infect Immun*, 75(2):1050-4.

McDowell JV, Huang B, Fenno JC, Marconi RT, Reynolds EC. 2009. Analysis of a unique interaction between the complement regulatory protein factor H and the periodontal pathogen *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 77(4):1417-25.

Medzhitov R 2007. TLR-mediated innate immune recognition. *Semin Immunol*, 19(1):1-2.

Megson ZA, Koerdt A, Schuster H, Ludwig R, Janesch B, Frey A, Naylor K, Wilson I, Stafford GP, Messner P, Schäffer C. Characterization of an α -L-fucosidase from the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Virulence*, 6(3):282-92.

Meyle J, Chapple I 2015. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000, 69(1):7-17.

Mishima E, Sharma A. 2011. *Tannerella forsythia* invasion in oral epithelial cells requires phosphoinositide 3-kinase activation and clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology*, 157(Pt 8):2382-91.

Mitchell HL, Dashper SG, Catmull DV, Paolini RA, Cleal SM, Slakeski N, Tan KH, Reynolds EC. 2010. *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiology*, 156(Pt 3):774-88.

Miyamoto M, Ishihara K, Okuda K. 2006. The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 74(4):2462-7.

Moncla BJ, Braham P, Hillier S L. 1990. Sialidase (neuraminidase) activity among gram-negative anaerobic and capnophilic bacteria. *J Clin Microbiol*, 28:422–425.

Moreira MS, de Freitas Archilla JR, Lascalea CA, Ramalho KM, Gutknecht N, Marques MM. 2015. Post-Treatment Apical Periodontitis Successfully Treated with Antimicrobial Photodynamic Therapy Via Sinus Tract and Laser Phototherapy: Report of Two Cases. *Photomed Laser Surg*.

Murakami Y, Higuchi N, Nakamura H, Yoshimura F, Oppenheim FG. 2002. *Bacteroides*

forsythus hemagglutinin is inhibited by N-acetylneuraminyllactose. *Oral Microbiol Immunol*, 17(2):125-8.

Myneni SR, Settem RP, Connell TD, Keegan AD, Gaffen SL, Sharma A. 2011. TLR2 signaling and Th2 responses drive *Tannerella forsythia*-induced periodontal bone loss. *J. Immunol*, 187:501–509.

Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. 2014. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*, 476068.

Nagano K, Hasegawa Y, Murakami Y, Nishiyama S, Yoshimura F. 2010. FimB regulates FimA fimbriation in *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*, 89(9):903-8.

Nakamura K, Yano H, Uchida H, Hashimoto S, Schaefer E, Sabe H. 2000. Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *J Biol Chem*, 275(35):27155-64.

Nakao R, Takashiba S, Kosono S, Yoshida M, Watanabe H, Ohnishi M, Senpuku H. 2014. Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. *Microbes Infect*, 16(1):6-16.

Nakayama K. 2015, *Porphyromonas gingivalis* and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. *J Periodontal Res*, 50(1):1-8.

Nishiyama S, Murakami Y, Nagata H, Shizukuishi S, Kawagishi I, Yoshimura F. 2007. Involvement of minor components associated with the FimA fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* in adhesive functions. *Microbiology*, 153(Pt 6):1916-25.

Niwa D, Nishikawa K, Nakamura H. 2011. A hybrid two-component system of *Tannerella forsythia* affects autoaggregation and post-translational modification of surface proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 318(2):189-96.

Nussbaum G, Ben-Adi S, Genzler T, Sela M, Rosen G. 2009. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in the innate immune response to *Treponema denticola* and its outer sheath components. *Infect Immun*, 77(9):3939-47.

Offenbacher S, Barros SP, Beck JD. 2008. Rethinking periodontal inflammation. *J. Periodontol*, 79(8 Suppl):1577-84.

Ogawa T, Hamada S. 1994. Hemagglutinating and chemotactic properties of synthetic peptide segments of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun*, 62: 3305–3310.

Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Uchida H. 2002. Bacterial fimbriae activate human peripheral blood monocytes utilizing TLR2, CD14 and CD11a/CD18 as cellular receptors. *Eur J Immunol*, 32(9):2543-50.

Ohara-Nemoto Y, Shimoyama Y, Kimura S, Kon A, Haraga H, Ono T, Nemoto TK. 2011. Asp- and Glu-specific novel dipeptidyl peptidase 11 of *Porphyromonas gingivalis* ensures utilization of proteinaceous energy sources. *J. Biol. Chem.* 286, 38115-38127.

Okuda T, Kimizuka R, Miyamoto M, Kato T, Yamada S, Okuda K, Ishihara K. 2007. *Treponema denticola* induces interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein 1 production in human umbilical vein epithelial cells. *Microbes Infect*, 9(7):907-13.

Olsen I. 2015. From the acta prize lecture 2014: the periodontal-systemic connection seen from a microbiological standpoint. *Acta Odontol Scand*, 73(8):563-8.

Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Kinane D, Hajishengallis G, Sharma A. 2008. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect. Immun*, 76:198–205.

Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. 2012. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract*, 12(3 Suppl):20-8.

Page RC. 1991. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res*.

Palm E, Khalaf H, Bengtsson T. 2015. Suppression of inflammatory responses of human gingival fibroblasts by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*, 30(1):74-85.

Park Y, Simionato MR, Sekiya K, Murakami Y, James D, Chen W, Hackett M, Yoshimura F, Demuth DR, Lamont RJ. 2005. Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun*, 73(7):3983-9.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanuos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183:3770-3783.

Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Brammar GC, Slakeski N, Reynolds EC. 2007. Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for *Porphyromonas gingivalis* virulence in the murine periodontitis model. *Infect Immun*, 75(3):1436-42

Pei J, Grishin NV. 2009. Prediction of a caspase-like fold in *Tannerella forsythia* virulence factor PrtH. *Cell Cycle*, 8(9):1453-5.

Pham K, Feik D, Hammond BF, Rams TE, Whitaker EJ. 2002. Aggregation of human platelets by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis* cells and membrane vesicles. *Platelets*, 13(1):21-30.

Pierce DL, Nishiyama S, Liang S, Wang M, Triantafilou M, Triantafilou K, Yoshimura F, Demuth DR, Hajishengallis G. 2009. Host adhesive activities and virulence of novel fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 77(8):3294-301.

Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer THT, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol*, 178:2876-2882

Pöllänen MT, Paino A, Ihalin R. 2013. Environmental stimuli shape biofilm formation and the virulence of periodontal pathogens. *clnt J Mol Sci*, 14(8):17221-37.

Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. 2007. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol*, 178(11):7242-50.

Posch G, Pabst M, Brecker L, Altmann F, Messner P, Schäffer C. 2011. Characterization and scope of S-layer protein O-glycosylation in *Tannerella forsythia*. *J Biol Chem*, 286(44):38714-24.

Posch G, Sekot G,[†] Friedrich V, Megson ZA, Koerdts A, Messner P, Schäffer C. 2012. Glycobiology Aspects of the Periodontal Pathogen *Tannerella forsythia*. *Biomolecules*, 2(4): 467–482.

Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000, 24:153-92.

Puthengady TB, Sun CX, Bajanova E, Ellen RP, Glogauer M. 2006. Modulation of human neutrophil functions in vitro by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect Immun*, 74(3):1954-7.

Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. 2004. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J. Leukoc. Biol*, 76:135-144.

Puschmann Ch. 2003. Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener Antibiotika auf *Porphyromonas gingivalis* in oralen Epithelzellen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Raby AC, Holst B, Davies J, Colmont C, Laumonnier Y, Coles B, Shah S, Hall J, Topley N, Köhl J, Morgan BP, Labéa MO. 2011. TLR activation enhances C5a-induced pro-inflammatory responses by negatively modulating the second C5a receptor, C5L2. *Eur J Immunol*, 41(9):2741-52.

Rapala-Kozik M, Bras G, Chruscicka B, Karkowska-Kuleta J, Sroka A, Herwald H, Nguyen KA, Eick S, Potempa J, Kozik A. 2011. Adsorption of components of the plasma kinin-forming system on the surface of *Porphyromonas gingivalis* involves gingipains as the major docking platforms. *Infect Immun*, 79(2):797-805.

Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM. 2013. Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol*. 15(2):334-46.

Rosen G, Sela MN, Bachrach G. 2012. The antibacterial activity of LL-37 against *Treponema denticola* is dentilisin protease independent and facilitated by the major outer sheath protein virulence factor. *Infect Immun*, 80(3):1107-14.

Ruby JD, Lux R, Shi W, Charon NW, Dasanayake A. 2008. Effect of glucose on *Treponema denticola* cell behavior. *Oral Microbiol Immunol*, 23(3):234-8.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. 2005. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res*, 84(1):59-63.

Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T, Um HS. 2003. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*, 149(Pt 12):3617-27.

Saiki K, Konishi K. 2010. Identification of a novel *Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein, PG534, required for the production of active gingipains. *FEMS Microbiol Lett*, 310(2):168-74.

Saito T., Ishihara K., Kato T. & Okuda, K. 1997. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65:4888–4891.

Sakakibara J, Nagano K, Murakami Y, Higuchi N, Nakamura H, Shimoizato K, Yoshimura F. 2007. Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology*, 153(Pt 3):866-76.

Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 3):841-9.

Sang SG, Rong H, Wang JB, Xie YQ. 2014. Effects of *Porphyromonas gingivalis* extracellular vesicles on human periodontal ligament fibroblasts. *Int J Clin Exp Med*,

7(2):379-83.

Sano Y, Okamoto-Shibayama K, Tanaka K, Ito R, Shintani S, Yakushiji M, Ishihara K. 2014. Dentilisin involvement in coaggregation between *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*. *Anaerobe*, ;30:45-50.

Sara M, Sleytr UB. 2000. S-Layer proteins. *J. Bacteriol*, 182:859–868.

Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, Nakayama K. 2010. A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(1):276-81.

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Bioll*, 71(3-4):435-78.

Sellers RM, Payne JB, Yu F, LeVan TD, Walker C, Mikuls TR. 2015. TLR4 Asp299Gly polymorphism may be protective against chronic periodontitis. *J Periodontal Res*.

Settem RP, Honma K, Nakajima T, Phansopa C, Roy S, Stafford GP, Sharma A . 2013. A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. *Mucosal Immunol*, 6(2):415-26.

Sekot G, Posch G, Messner P, Matejka M, Rausch-Fan X, Andrukhov O, Schäffer C. 2011. Potential of the *Tannerella forsythia* S-layer to delay the immune response. *J Dent Res*, 90(1):109-14.

Serhan CN. 2008. Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. *J Periodontol*, 79(8 Suppl):1520-6.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, 8(5):349-61

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *ASEB J*, 21(2):325-32.

Seymour GJ. 1991.Importance of the host response in the periodontium. J Clin Periodontol, 18(6):421-6.

Seymour GJ, Gemmell E. 2001. Cytokines in periodontal disease: where to from here? Acta Odontol Scand, 59(3):167-73.

Sharma A. 2010. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. Periodontol 2000, 54(1):106-16.

Sharma A, Inagaki S, Honma K., Sfintescu C, Baker PJ, Evans R.T. 2005. *Tannerella forsythia*-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. J. Dent. Res, 84:462–467.

Sharma A, Novak EK, Sojar HT, Swank RT, Kuramitsu HK, Genco RJ 2000. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. Oral Microbiol Immunol, 15(6):393-6.

Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ. 1998. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. Infect Immun, 66(12):5703-10.

Sheets SM, Potempa J, Travis J, Casiano CA, Fletcher HM. 2005. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. Infect Immun, 73(3):1543-52.

Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, Yoshimura F, Noguchi K, Komatsuzawa H. 2013. The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. Infect Immun, 81(4):1198-206.

Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. 2015. Host response mechanisms in periodontal diseases. J Appl Oral Sci. 23(3):329-55.

Sim JH, Shi W, Lux R. 2005.Protein-protein interactions in the chemotaxis signalling pathway of *Treponema denticola*. Microbiology, 151(Pt 6):1801-7.

Sims TJ, Schifferle RE, Ali RW, Skaug N, Page RC. 2001. Immunoglobulin G response of periodontitis patients to *Porphyromonas gingivalis* capsular carbohydrate and lipopolysaccharide antigens. *Oral Microbiol Immunol*, 16(4):193-201.

Slots J. 1986. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol*, 13(10):912-7.

Socransky SS. 1979. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 6(7):16-21.

Socransky SS, Haffajee AD. 1994. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*, 5:7-25.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. 2002. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease *J Clin Periodontol*, 29(3):260-8.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Ferres M, Mager D. 1999. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol 2000*, 20:341-62.

Su H, Yan X, Dong Z, Chen W, Lin ZT, Hu QG. 2015. Differential roles of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide and *Escherichia coli* lipopolysaccharide in maturation and antigen-presenting functions of dendritic cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(13):2482-92.

Suwannakul S, Stafford GP, Whawell SA, Douglas CW. 2010. Identification of bistable populations of *Porphyromonas gingivalis* that differ in epithelial cell invasion. *Microbiology*, 156(Pt 10):3052-64.

Takashiba S, Naruishi K. 2006. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol 2000*, 40:94-106.

Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y .2003. Perspective of cytokine regulation for

periodontal treatment: fibroblast biology. J Periodontol, 74(1):103-10.

Takashiba S, Ohyama H, Oyaizu K, Kogoe-Kato N, Murayama Y. 1999. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. J Periodontal Res. 34(7):374-8

Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson FC 3rd, Genco CA. 2006. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in Porphyromonas gingivalis infected human aortic endothelial cells. Cell Microbiol, 8(5):738-57.

Takemoto T, Kurihara H, Dahlen G. 1997. Characterization of Bacteroides forsythus isolates. J Clin Microbiol, 35(6):1378-81.

Tamai R, Asai Y, Ogawa T. 2005. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by Porphyromonas gingivalis. Infect Immun, 73(10):6290-8.

Tan KH, Seers CA, Dashper SG, Mitchell HL, Pyke JS, Meuric V, Slakeski N, Cleal SM, Chambers JL, McConville MJ, Reynolds EC. 2014. Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola exhibit metabolic symbioses. PLoS Pathog. 10(3):e1003955.

Tanabe S, Bodet C, Grenier D. 2008. Treponema denticola lipooligosaccharide activates gingival fibroblasts and upregulates inflammatory mediator production. J Cell Physiol, 216(3):727.

Tanner AC, Izard J. 2006. Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. Periodontol 2000,42:88-113.

Terheyden H, Stadlinger B, Sanz M, Garbe AI, Meyle J. 2014. Inflammatory reaction - communication of cells. Clin Oral Implants Res. 25(4):399-407.

Thompson H, Homer KA, Rao S, Booth V, Hosie AH. 2009. An orthologue of Bacteroides fragilis NanH is the principal sialidase in Tannerella forsythia. J Bacteriol, 191(11):3623-8.

Thorbert-Mros S, Larsson L, Berglundh T. 2014. Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions. J Periodontal Res, 50(4):535-43.

Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. 1997. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J Periodontal Res, 32(1 Pt 2):120-5.

Tribble GD, Kerr JE, Wang BY. 2013. Genetic diversity in the oral pathogen Porphyromonas gingivalis: molecular mechanisms and biological consequences. Future Microbiol, 8(5):607-20.

Tsuda K, Amano A, Umebayashi K, Inaba H, Nakagawa I, Nakanishi Y, Yoshimori T. 2007. Molecular dissection of internalization of Porphyromonas gingivalis by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. Cell Struct Funct, 30(2):81-91.

Tsuda K, Furuta N, Inaba H, Kawai S, Hanada K, Yoshimori T, Amano A. 2008. Functional analysis of alpha5beta1 integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by Porphyromonas gingivalis using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. Cell Struct Funct, 33(1):123-32.

Umemoto T, Jinno T, Taiji Y, Ogawa T. 2001. Chemotaxis of oral treponemes toward sera and albumin of rabbit. Microbiol Immunol. 45(8):571-7.

Vaithilingam RD, Safii SH, Baharuddin NA, Ng CC, Cheong SC, Bartold PM, Schaefer AS, Loos BG. 2014. Moving into a new era of periodontal genetic studies: relevance of large case-control samples using severe phenotypes for genome-wide association studies. J Periodontal Res, 49(6):683-95.

Takashiba S, Naruishi K. 2006. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. Periodontol 2000, 40:94-106.

Van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, Strooker H, van Winkelhoff AJ. 2006. prtH in Tannerella forsythensis is not associated with periodontitis. J Periodontol, 77(4):586-90.

Van Steenberghe TJ, Delemarre FG, Namavar F, De Graaff J. 1987. Differences in virulence within the species Bacteroides gingivalis. Antonie Van Leeuwenhoek, 53(4):233-44.

Veening JW, Stewart EJ, Berngruber TW, Taddei F, Kuipers OP, Hamoen LW. 2008. Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development. Proc Natl Acad Sci U S A,

105(11):4393-8.

Veith PD, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Paolini RA, Orth R, Walsh KA, Reynolds EC. 2009. Major proteins and antigens of *Treponema denticola*. *Biochim Biophys Acta*, 1794(10):1421-32.

Veith PD, Chen YY, Gorasia DG, Chen D, Glew MD, O'Brien-Simpson NM, Cecil JD, Holden JA, Reynolds EC. 2014. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *J Proteome Res*, 13(5):2420-32.

Vernal R, Díaz-Zúñiga J, Melgar-Rodríguez S, Pujol M, Diaz-Guerra E, Silva A, Sanz M, Garcia-Sanz JA. 2014. Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *J Clin Periodontol*, 41(5):451-9.

Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. 2000. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3):1161-7.

Wang YL, Pan KQ, Sun Y, Deng J. 2014. Effect of lipopolysaccharide on the expression of ALP,BSP,DSPP in rat dental pulp cells. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 23(4):431-5.

Wang M, Shakhathreh MA, James D, Liang S, Nishiyama S, Yoshimura F, Demuth DR, Hajishengallis G. 2007. Fimbrial proteins of *porphyromonas gingivalis* mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages. *J Immunol*, 179(4):2349-58.

Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, Triantafilou M, Triantafilou K, Lambris JD, Hajishengallis G. 2010. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci Signal*, 3(109):ra11.

Wensink J, Witholt B. 1981. Outer-membrane vesicles released by normally growing *Escherichia coli* contain very little lipoprotein. *Eur J Biochem*, 116(2):331-5.

Whittaker CJ, Clemans DL, Kolenbrander PE. 1996. Insertional inactivation of an intragenomic coaggregation-relevant adhesin locus from *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis). *Infect Immun*, 64(10):4137-42.

Wolf F, Rateitschak H. 2012. *Farbatlant der Zahnmedizin 1- Parodontologie*. Thieme.

Ximinez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27(9):648-57.

Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. 2002. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol*, 4(5):305-14.

Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM 2004. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 72(7):3743-51.

Yilmaz O, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. 2003. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology*, 149(Pt 9):2417-26.

Yoshino T, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Dahlén G. 2007. Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses. *FEMS Microbiol Lett*, 270(1):75-81.

Yoo JY, Kim HC, Zhu W, Kim SM, Sabet M, Handfield M, Hillman J, Progulske-Fox A, Lee SW. 2007. Identification of *Tannerella forsythia* antigens specifically expressed in patients with periodontal disease. *FEMS Microbiol Lett*, 275(2):344-52.

Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. 1999. The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontol 2000*, 20:239-88.

Zhang W, Ju J, Rigney T, Tribble G . 2013. Integrin $\alpha 5\beta 1$ -fimbriae binding and actin rearrangement are essential for *Porphyromonas gingivalis* invasion of osteoblasts and subsequent activation of the JNK pathway. *BMC Microbiol*, 13:5.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Wolfgang Pfister für die Möglichkeit, die Überlassung des Themas, seinem Fachwissen und seiner freien Zeit, die er für mich opferte.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Ganz besonderem Dank gilt meinem Mann, dafür dass er für unsere Kinder und mich der beste Vater und Ehemann der Welt ist und unseren Kindern, die dafür sorgen, dass unsere Welt bunt bleibt.

Lebenslauf

Maja Anna- Böttcher

15.8.1972 in Greifswald

Neunkircher Str. 131

66113 Saarbrücken

Tel: 0681- 49488

Eltern

Sigrun Böttcher, geb. Lembke Fotografenmeisterin

Dr. Volker Böttcher Zahnarzt, Arzt für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Familienstand

verheiratet mit Walter Anna Dipl. Ingenieurinformatik

Kinder: Noah Anna, 17.7.2000

Laurin Anna, 19.10.2004

Charlotte Anna, 5.9.2007

Schule/ Studium

1979-1983 Grundschule Schafbrücke, Saarbrücken

1983-1990 Deutsch- Französisches- Gymnasium, Saarbrücken

1990-1991 Realschule Ludwigspark, Saarbrücken

1991-1993 Wirtschaftsschulen Saarbrücken, Fachoberschule Wirtschaft

1993-1996 Kaufmännisches Bildungszentrum Saarbrücken, Halberg

1993-1996 Abendgymnasium Saarbrücken

1996-2002 Studium der Zahnmedizin, Universitätsklinikum Homburg

8/2002 Approbation Zahnmedizin

12/2009 Anerkennung der Weiterbildung zur Fachzahnärztin für
Oralchirurgie

9/2013 Ernennung zum Master of Science (M.Sc.) „Parodontologie und
Implantattherapie“ der DIU/DGParo

Berufsausbildung und Berufspraxis

- 1992-1993 Praktikum Allgemeiner Finanzdienst GmbH
- 1993-1996 Ausbildung zur Arzthelferin
- 2002-2007 Zahnärztin der Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Universitätskliniken Homburg/Saar
- 2010-2012 Zulassung und Teilhaber in der Gemeinschaftspraxis
Dr. C. Assaf, Dr. V. Böttcher, M. Anna-Böttcher, Saarbrücken
- 2013-heute Teilhaber in der Gemeinschaftspraxis
Dr. Assaf, A.-K.Böttcher und M. Anna-Böttcher M.Sc., Saarbrücken

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der FriedrichSchiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil. W. Pfister

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde

und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Saarbrücken, den

Maja Anna-Böttcher